

**Untersuchungen zur Giemsa-Bandenfärbung
menschlicher Metaphasechromosomen an Hand
der vorbehandlungsfreien Methode von Walther**

Manfred Endres

1482

Aus der Abteilung für Pädiatrische Genetik Leiter: Prof.Dr.J.Murken
an der Kinderpoliklinik der Universität München
Direktor: Prof.Dr.H.Spiess

Untersuchungen zur Giemsa-Bandenfärbung menschlicher
Metaphasechromosomen an Hand der vorbebehandlungsfreien Methode
von Walther

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Manfred Endres
aus
Bad Tölz
1982

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Professor Dr. J. Murken

Mitberichterstatter: Professor Dr. H. Spiess

Dekan: Professor Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 19.10.1982



Verzeichnis der Werke		
Verzeichnis der Werke		
1.1	1.1.1	1.1.1.1
1.2	1.2.1	1.2.1.1
1.3	1.3.1	1.3.1.1
1.4	1.4.1	1.4.1.1
1.5	1.5.1	1.5.1.1
1.6	1.6.1	1.6.1.1
1.7	1.7.1	1.7.1.1
1.8	1.8.1	1.8.1.1
1.9	1.9.1	1.9.1.1
1.10	1.10.1	1.10.1.1
1.11	1.11.1	1.11.1.1
1.12	1.12.1	1.12.1.1
1.13	1.13.1	1.13.1.1
1.14	1.14.1	1.14.1.1
1.15	1.15.1	1.15.1.1
1.16	1.16.1	1.16.1.1
1.17	1.17.1	1.17.1.1
1.18	1.18.1	1.18.1.1
1.19	1.19.1	1.19.1.1
1.20	1.20.1	1.20.1.1
1.21	1.21.1	1.21.1.1
1.22	1.22.1	1.22.1.1
1.23	1.23.1	1.23.1.1
1.24	1.24.1	1.24.1.1
1.25	1.25.1	1.25.1.1
1.26	1.26.1	1.26.1.1
1.27	1.27.1	1.27.1.1
1.28	1.28.1	1.28.1.1
1.29	1.29.1	1.29.1.1
1.30	1.30.1	1.30.1.1
1.31	1.31.1	1.31.1.1
1.32	1.32.1	1.32.1.1
1.33	1.33.1	1.33.1.1
1.34	1.34.1	1.34.1.1
1.35	1.35.1	1.35.1.1
1.36	1.36.1	1.36.1.1
1.37	1.37.1	1.37.1.1
1.38	1.38.1	1.38.1.1
1.39	1.39.1	1.39.1.1
1.40	1.40.1	1.40.1.1
1.41	1.41.1	1.41.1.1
1.42	1.42.1	1.42.1.1
1.43	1.43.1	1.43.1.1
1.44	1.44.1	1.44.1.1
1.45	1.45.1	1.45.1.1
1.46	1.46.1	1.46.1.1
1.47	1.47.1	1.47.1.1
1.48	1.48.1	1.48.1.1
1.49	1.49.1	1.49.1.1
1.50	1.50.1	1.50.1.1
1.51	1.51.1	1.51.1.1
1.52	1.52.1	1.52.1.1
1.53	1.53.1	1.53.1.1
1.54	1.54.1	1.54.1.1
1.55	1.55.1	1.55.1.1
1.56	1.56.1	1.56.1.1
1.57	1.57.1	1.57.1.1
1.58	1.58.1	1.58.1.1
1.59	1.59.1	1.59.1.1
1.60	1.60.1	1.60.1.1
1.61	1.61.1	1.61.1.1
1.62	1.62.1	1.62.1.1
1.63	1.63.1	1.63.1.1
1.64	1.64.1	1.64.1.1
1.65	1.65.1	1.65.1.1
1.66	1.66.1	1.66.1.1
1.67	1.67.1	1.67.1.1
1.68	1.68.1	1.68.1.1
1.69	1.69.1	1.69.1.1
1.70	1.70.1	1.70.1.1
1.71	1.71.1	1.71.1.1
1.72	1.72.1	1.72.1.1
1.73	1.73.1	1.73.1.1
1.74	1.74.1	1.74.1.1
1.75	1.75.1	1.75.1.1
1.76	1.76.1	1.76.1.1
1.77	1.77.1	1.77.1.1
1.78	1.78.1	1.78.1.1
1.79	1.79.1	1.79.1.1
1.80	1.80.1	1.80.1.1
1.81	1.81.1	1.81.1.1
1.82	1.82.1	1.82.1.1
1.83	1.83.1	1.83.1.1
1.84	1.84.1	1.84.1.1
1.85	1.85.1	1.85.1.1
1.86	1.86.1	1.86.1.1
1.87	1.87.1	1.87.1.1
1.88	1.88.1	1.88.1.1
1.89	1.89.1	1.89.1.1
1.90	1.90.1	1.90.1.1
1.91	1.91.1	1.91.1.1
1.92	1.92.1	1.92.1.1
1.93	1.93.1	1.93.1.1
1.94	1.94.1	1.94.1.1
1.95	1.95.1	1.95.1.1
1.96	1.96.1	1.96.1.1
1.97	1.97.1	1.97.1.1
1.98	1.98.1	1.98.1.1
1.99	1.99.1	1.99.1.1
2.00	2.00.1	2.00.1.1

Meinen Eltern



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Inhaltsverzeichnis	Seite
--------------------	-------

Verzeichnis der Abbildungen

Verzeichnis der Tabellen

1.	Einleitung	1
2.	Literaturübersicht	2
2.1.	Kurzer Abriß der Entwicklung der Chromosomendarstellung	2
2.2.	Cytogenetische Untersuchungsmethoden	4
2.2.1.	Die mikroskopische Darstellung von Chromosomen	4
2.2.2.	Konventionelle Färbemethoden	4
2.2.3.	Autoradiographie	6
2.2.4.	Differentielle Färbemethoden	7
2.2.4.1.	Quinacrin Fluoreszenz-Banden (Q-Banden)	7
2.2.4.2.	Die C(entromer)-Bandentechnik (C-Banden)	10
2.2.4.3.	Giemsa Banden-Färbung (G-Banden)	13
2.2.4.4.	R(everse)-Banden, T(elomer)-Banden	13
2.2.4.5.	Feulgen-Banden	18
2.2.4.6.	N-Banden, NOR-Färbung	18
2.2.5.	Nomenklatur der Chromosomenbanden	20
2.2.6.	Phylogenetische und funktionelle Gesichtspunkte der Chromosomenbanden	20
2.3.	Befunde zur Chromosomenstruktur	24
2.3.1.	Nukleinsäuren	24
2.3.1.1.	Struktur der DNS	24
2.3.1.2.	Differenzierung der DNS mit biochemischen Methoden	25
2.3.1.3.	Unterschiedliche Verteilung verschiedener DNS-Klassen auf den Metaphasechromosomen	26
2.3.2.	Chromosomale Proteine	27
2.3.2.1.	Histone	27
2.3.2.2.	Nicht-Histon Proteine	28
2.3.3.	Das Nukleosomenmodell - Feinstruktur und Aufbau des Chromatinfadens	29
2.3.4.	Anordnung des Chromatinfadens in Metaphasechromosomen	32
2.3.5.	Zentrales Chromosomengerüst - ein Artefakt?	35

2.4.	Einfluß von Präparationsschritten auf die Chromosomenstruktur und ihre mögliche Bedeutung für die G-Bandenentstehung	39
2.4.1.	Hypotonie und Fixierung	39
2.4.2.	Einfluß von Vorbehandlungsschritten der G-Bandenmethoden	41
2.4.2.1.	Enzyme	41
2.4.2.2.	pH, Temperatur und Ionenkonzentration	42
2.4.3.	Einfluß des Farbstoffes auf die Chromosomen	44
2.4.3.1.	Struktur und Zusammensetzung von Giemsa- und Leishman-Farbstoffen	44
2.4.3.2.	Bindung des Farbstoffes an das Chromatin	46
2.5.	Erklärungsversuche für die Entstehung von G-Banden	48
2.5.1.	Unterschiedliche Chromatinverteilung	48
2.5.2.	Unterschiedliche DNS-Zusammensetzung	48
2.5.3.	Beteiligung der Histone	49
2.5.4.	Bindung spezifischer Farbstoffkomplexe an spezifische Stellen des Chromatinfadens. - Mögliche Beteiligung von Nicht-Histon-Proteinen	50
3.	Problematik	51
4.	Material und Methode	52
4.1.	Chromosomenpräparation	52
4.1.1.	Kulturansatz	52
4.1.2.	Kulturabbruch	52
4.1.3.	Hypotone Behandlung	53
4.1.4.	Fixation	53
4.1.5.	Herstellung der Präparate	53
4.2.	Die Färbung	53
4.2.1.	Giemsa-Bandenfärbung nach Walther	53
4.2.2.	Modifizierte G-Bandenfärbung nach Walther	54
4.2.3.	Photometrische Analyse des Farbstoffes	55
4.2.4.	Variationen von Farbstoff- bzw. Pufferanteil der Färbelösung	55
4.3.	Einbettung	55
4.4.	Mikroskopie	55
4.5.	Mikrophotographie	56

5.	Ergebnisse	57
5.1.	Morphologie der Chromosomen vor der Färbung	57
5.2.	Dynamik des Färbevorganges	59
5.3.	Einfluß des Farbstoffes auf die G-Banden- entstehung	60
5.3.1.	Spektrophotometrische Analyse des Farbstoffes	60
5.3.2.	Variation der Farbstoffquantität im Farbansatz	60
5.3.3.	Veränderung der Farbstoffqualität im Farbansatz	63
5.4.	Analyse des Einflusses der Pufferlösung auf die Bandenentstehung	65
5.4.1.	Änderung der Osmolarität der Färbelösung	65
5.4.2.	Änderung der Pufferkonzentration der Färbelösung	67
5.4.3.	Variation der Pufferionen in der Färbelösung	68
5.5.	Parallele Veränderung von Puffer und Farbstoffkonzentration	71
6.	Diskussion	73
6.1.	Morphologischer Zustand der Chromosomen nach der Fixierung	73
6.2.	Die Bedeutung der chromosomalen Schwellung für die G-Bandenentstehung	74
6.3.	G-Bandenentstehung durch Bindung von Farbstoff- polymeren an bestimmte Chromosomenbezirke	76
6.4.	Die Bedeutung der Kationenkonzentration in der Färbelösung	77
6.5.	Kationen konkurrieren mit Farbstoffpolymeren um die Bindung an bestimmte Chromosomenbezirke	78
6.6.	Bandenmechanismus	81
6.7.	Chromosomenmodell	82
7.	Zusammenfassung	86
8.	Literaturverzeichnis	87

Abb. 1	Homogen (konventionell) angefärbte menschliche Metaphasechromosomen (Färbung mit Giemsa)	5
Abb. 2	Q-(uinacrin) Bandenfärbung menschlicher Metaphasechromosomen mit deutlicher Fluoreszenz des Y-Chromosoms (Methode nach Caspersson)	9
Abb. 3	C-(entromer) Bandenfärbung menschlicher Metaphasechromosomen (Methode nach Sumner)	11
Abb. 4	G-(iemsa) Bandenfärbung menschlicher Metaphasechromosomen (Methode nach Walther 1974)	14
Abb. 5	R-(everse) Bandenfärbung menschlicher Metaphasechromosomen (Methode nach Dutrillaux 1971)	15
Abb. 6	Schematische Darstellung der Chromosomen nach der Paris-Nomenklatur 1971	21
Abb. 7	Schematische Darstellung der Chromosomen nach der Paris Folgekonferenz 1975	22
Abb. 8	G-Bandenschema des Chromosoms Nr. 1 zu unterschiedlichen Zeitpunkten in der Mitose; Yunis et al. 1978	23
Abb. 9	Primär- (a) u. -Sekundärstruktur (b) der DNS (aus Daumer 1977)	24
Abb. 10	Nukleosomenmodell aus Li 1975	30
Abb. 11	Nukleosomenmodell aus Kornberg 1977	30
Abb. 12	"Solenoidales" Modell der 300 Å Nukleosomenfaser (Finch u. Klug 1976)	31
Abb. 13	Chromosomenmodell von Sedat u. Manuelidis 1978	33
Abb. 14	Chromosomenmodell (Back u. Zeuthen 1978)	34
Abb. 15	Modell der Chromosomenstruktur höherer Wirbeltiere aus Comings 1978	36
Abb. 16	Chromosomenmodell von Laemmli et al. 1978	37
Abb. 17	Strukturformeln der Thiazin Farbstoffe aus Comings 1975	44
Abb. 18	Darstellung des Färbevorganges der Chromosomen 1 u. 2	57
Abb. 19	Darstellung des Färbevorganges eines Ausschnittes aus der gleichen Metaphase	58
Abb. 20	Spektrophotometrische Analyse der Färbelösung	61
Abb. 21	Einfluß der Farbstoffkonzentration auf die G-Bandenentstehung	62
Abb. 22	Einfluß von Methanol auf die Absorptionskurven und das Färbeergebnis	64

Abb. 23	Einfluß unterschiedlicher Ionenkonzentrationen auf die G-Bandenentstehung	66
Abb. 24	Einfluß unterschiedlicher Ionen auf die G-Bandenentstehung	70
Abb. 25	Schematische Darstellung der Konkurrenzreaktion von Farbstoffmolekülen und Kationen	80
Abb. 26	Schematische Darstellung der höheren Bindungsstärke von Mg an die DNS im Vergleich zu Na	80
Abb. 27	Chromosomenmodell (Erläuterung im Text)	84

Verzeichnis der Tabellen	Seite
Tab. 1 Centromer-Bandentechniken	12
Tab. 2a Giemsa-Bandentechniken, Vorbehandlung mit Laugen und/oder erwärmten Ionenlösungen	16
Tab. 2b Giemsa-Bandentechniken, Vorbehandlungen mit Enzymen, andere oder keine Vorbehandlungen	17
Tab. 3 R-Banden-, T-Banden-, Feulgen-Bandentechniken und NOR-Färbung	19
Tab. 4 Nomenklatur der Histone aus Fellenberg 1974	27
Tab. 5 Ablösung der Histone vom Chromatin mit unterschiedlichen essigsäurehaltigen Fixativen	39
Tab. 6 Änderung der Osmolarität in der Färbelösung	65
Tab. 7 Wirkung paralleler Veränderung von Farbstoffkonzentration und Pufferkonzentration auf die G-Bandenentstehung	72

1. Einleitung

Seit ca. 25 Jahren ist es nunmehr möglich, menschliche Chromosomen von guter Qualität darzustellen und numerische und grob strukturelle Abweichungen zu erkennen (Tijo u. Levan 1956). Jedoch erst die Einführung neuer Färbemethoden, mit deren Hilfe auch kleine Strukturveränderungen erkannt werden können, machte es möglich, eine Reihe unklarer Mißbildungssyndrome als Chromosomensyndrome zu definieren.

1974 wurde eine vereinfachte Giemsa-Banden Färbung von Ullrich Walther im Genetischen Labor an der Kinderpoliklinik für die Chromosomendiagnostik eingeführt.

Da die Reproduzierbarkeit dieser Färbemethode in der Routinediagnostik anfänglich erhebliche Schwierigkeiten bereitete, war es meine Aufgabe, die Faktoren zu ergründen, die ursächlich an der Bandenentstehung beteiligt sind.

Um dieser Aufgabe gerecht zu werden, unterzog ich die einzelnen Schritte der Chromosomenpräparation und Färbung einer eingehenden Analyse und prüfte ihren Einfluß auf die Bandenentstehung durch Variation sämtlicher Verarbeitungsschritte.

2. Literaturübersicht

2.1. Kurzer Abriß der Entwicklung der Chromosomendarstellung (aus Murken u. Wilmowsky 1973)

Unter dem Namen "Transitorische Chloroblasten" findet man in einem von Nägeli 1842 veröffentlichten Werk über die Entwicklungsgeschichte des Pollens die erste Beschreibung von Chromosomen. In der zweiten Hälfte des 19. Jahrhunderts machte dank verbesserter mikroskopischer Technik die Erforschung der Zellteilungsvorgänge weitere Fortschritte. Straßburger und Bütschli entdeckten die Kernspindel 1875, Fleming 1881, beschreibt die Längsteilung der Chromosomen, deren Namen (Chroma=Farbe, Soma=Körper) Waldeyer 1888 prägte und deren konstante Zahl Hertwig bereits 1882 erkannte.

Bis in die dreißiger Jahre blieben Untersuchungen über Zellteilungen auf männliche Keimzellen beschränkt, da somatisches Gewebe eine zu geringe Zellteilungsrate aufwies, um Chromosomen der Metaphase darstellen zu können. Erst die Einführung von Gewebekulturen von Tumorzellen machte eine Chromosomenanalyse an somatischem Gewebe möglich. 1956 wurde dann aufgrund verbesserter präparativer Techniken von Tijo und Levan und von Ford und Hamerton die richtige Chromosomenzahl des Menschen, nämlich 46, bestimmt. Die Verwendung des Spindelgiftes Colchizin durch Ford und Hamerton 1956 reicherte die Mitosenzahl im Präparat an. Die Verwendung von hypotoner Lösung vor Fixierung der Zellen mit Essigsäure verbesserte ebenfalls die Qualität der Chromosomendarstellungen. Die heute üblicherweise angewandte Methode zur Chromosomendarstellung aus Lymphozyten des peripheren Blutes, die mit Phythämagglutinin (Nowell und Hungerford 1960) stimuliert werden, geht auf die Angaben von Moorhead et al. 1960 und von Arakaki und Sparkes 1963 zurück.

Mit ähnlichen Methoden ist es heute möglich, Chromosomen aus sich spontan teilenden Geweben (z.B. Haut, innere Organe, Knochenmark) oder Fruchtwasserzellen zu gewinnen.

Durch Einführung differentieller Färbemethoden wurde es Anfang der siebziger Jahre möglich, nicht nur über Zahl und Form, sondern auch über kleinere Strukturveränderungen der Chromosomen, Aussagen zu machen. So wurden zu den bisher bekannten, relativ häufigen Chromosomenanomalien wie Trisomie 21, 13, 18 weitere seltenere Chromosomenveränderungen entdeckt und als Chromosomensyndrome des Menschen beschrieben (partielle Trisomien und Monosomien einzelner Chromosomensegmente).

2.2. Cytogenetische Untersuchungsmethoden

2.2.1. Die mikroskopische Darstellung von Chromosomen

Im Lichtmikroskop erhält man ein zweidimensionales Bild des untersuchten Materials. Bestimmte Strukturen sind nur dann deutlich voneinander unterscheidbar, wenn sie eine unterschiedliche Lichtdurchlässigkeit aufweisen oder unterschiedliche Wellenlängen des Lichtes absorbieren, d.h. eine unterschiedliche Farbe besitzen.

Die unterschiedliche Dichte verschiedener Strukturen macht sich das Prinzip des Phasenkontrastes zunutze. Im Phasenkontrastmikroskop werden Dichteunterschiede im Präparat in Helligkeitsunterschiede umgewandelt und so für das menschliche Auge unterscheidbar gemacht.

Da beim Phasenkontrastmikroskop das Auflösungsvermögen nur unzureichend ist, wird in der zytogenetischen Diagnostik in erster Linie das Hellfeld-Durchlicht-Mikroskop verwendet. Das Präparat wird von einer Lichtquelle durchleuchtet und muß vor der Untersuchung mit einem geeigneten Farbstoff angefärbt werden. In der zytogenetischen Diagnostik spielen daher verschiedene Färbetechniken eine wichtige Rolle, da durch geeignete Auswahl der Farbstoffe selektiv bestimmte Strukturen angefärbt werden können.

2.2.2. Konventionelle Färbemethoden (Abb.1)

In dem Handbuch "Mikroskopische Technik" (Romeis 1968) sind zahlreiche Färbemethoden beschrieben, die eine homogene Anfärbung von Chromosomen ermöglichen. Zu ihnen gehören neben anderen Orcein Färbung, Feulgen Reagenz, Karminessigsäure-Färbung und Giemsa Farbstoffe. Man kann mit diesen Färbungen die Länge der Chromosomen, sowie die Lage des Centromers bestimmen und die Chromosomen aufgrund dieser Parameter in verschiedene Gruppen einteilen, die auf den Chromosomenkonferenzen 1960 in Denver und 1966 in Chicago festgelegt worden sind. Eine weitergehende Differenzierung innerhalb dieser Gruppen ist mit den konventionellen Färbemethoden nicht möglich.



Abb. 1 Homogen (konventionell) angefärbte menschliche Metaphase-
chromosomen (Färbung mit Giemsa)

2.2.3. Autoradiographie - Erster Ansatz zu einer weitergehenden Differenzierung der Chromosomen

Die Autoradiographie war die erste Methode, mit der eine weitergehende Differenzierung der Chromosomen gelang (Morishima et al.1962, German 1962, Gilbert et al.1962).

Einer Lymphozytenkultur gibt man zu einem bestimmten Zeitpunkt in der späten DNS-Synthesephase radioaktiv markiertes Thymidin zu. Diejenigen Chromosomenabschnitte, die zu diesem Zeitpunkt ihre DNS-Synthese noch nicht abgeschlossen haben, bauen das radioaktive Thymidin ein. Die Chromosomenpräparate werden anschließend mit einer Filmschicht überzogen. Nach ca. 3 Wochen wird die Filmschicht entwickelt. Die Filmschicht weist dann an den Stellen vermehrt belichtete Silberkörner auf, die über Chromosomenabschnitten liegen, in welchen radioaktiv markiertes Tritium eingebaut wurde; es handelt sich hierbei um spät replizierende Chromosomenabschnitte. Da unterschiedliche Chromosomenabschnitte zu verschiedenen Zeitpunkten ihre DNS replizieren, weist jedes Chromosom ein charakteristisches Replikationsmuster auf, sodaß einzelne Chromosomenpaare aufgrund ihres Replikationsmusters identifiziert werden können.

2.2.4. Differentielle Färbemethoden

Anfang der siebziger Jahre sind Färbemethoden entwickelt worden, die unterschiedliche Chromosomenabschnitte anfärben (Übersichten bei Lubs et al. 1973, Dutrillaux u. Lejeune 1975, Hsu 1974). Die Färbemethode wird entweder nach Art des verwendeten Farbstoffes (Q-Banden Quinacrin, G-Banden Giemsa) oder nach Art der angefärbten Strukturen (R-Banden=reverse bezüglich der G-Banden, NOR Färbung Nukleolus organisierende Region, C-Banden Centromer Heterochromatin) bezeichnet. In den letzten Jahren hat sich eine weitergehende Nomenklatur durchgesetzt, die die Färbemethoden noch genauer bezeichnet und sowohl Art der Banden, als auch Art der Vorbehandlung und Färbung beinhaltet. (z.B. Methode nach Walther et al. 1974 GSL Technik, G: Giemsa-Banden, S: Sörensen Puffer, L: Färbung mit Leishmann Farbstoff).

2.2.4.1. Quinacrin Fluoreszenz Banden (Q-Banden) (Abb.2)

1967 berichteten Caspersson et al. von unterschiedlich stark fluoreszierenden Bezirken auf Metaphasechromosomen von *Trillium erectum*, *Vicia faba* und des chinesischen Hamsters, die mit Quinacrin Mustard gefärbt waren. Es war das Ergebnis langer Suche nach einer Substanz, die geeignet war, die Verteilung der DNS entlang der Metaphasechromosomen darzustellen. Drei Jahre später berichtete Caspersson et al. 1969, 1970 über die Identifizierung eines jeden menschlichen Metaphasenchromosomenpaares aufgrund eines spezifischen Bandenmusters auf den Chromosomenarmen nach Färbung mit Quinacrin Mustard und bewies die Konstanz der als Q-Banden in die Literatur eingegangenen, fluoreszierenden Strukturen mittels mikrodensitometrischer Aufzeichnung. Seit der Veröffentlichung von Caspersson et al. 1967 und 1970 sind eine Reihe von Modifikationen bekannt geworden, eine wesentliche Veränderung der Originalvorschrift hat sich jedoch nicht durchgesetzt (Zech 1973).

Die Blutkulturen werden wie üblich verarbeitet. Es können auch andere Chromosomenpräparationen, wie Fibroblasten oder pflanzliche Präparate, mit Fluoreszenzbanden gefärbt werden. Die luftgetrockneten Präparate werden ohne Vorbehandlung in Quinacrin Mustard oder Quinacrin Dihydrochlorid (Atebrin) gefärbt. Eine Besonderheit der Q-Bandenfärbung ist die starke Fluoreszenz des Y-Chromosoms, die auch am Interphasekern zu beobachten ist und in der routinemäßigen Kerngeschlechtsbestimmung Anwendung gefunden hat (Caspersson et al. 1970, Pearson et al. 1970, Hatfield et al. 1975).

Der Quinacrin Fluoreszenzfarbstoff ist in seiner Struktur bekannt, was zu zahlreichen Untersuchungen geführt hat, die sich mit seiner Bindung an die DNS beschäftigen (Calderon u. Schnedl 1973, Modest 1973, Riegler 1973, Selander 1973, 1974, Bostock u. Christie 1974, Limon et al. 1977, Comings et al. 1978). Adenin-Thymin-reiche DNS-Abschnitte verstärken die Quinacrin Fluoreszenz, Guanin-Cytosin-reiche DNS-Abschnitte schwächen sie ab (Weißblum u. de Haseth, Pachmann u. Riegler 1972, Comings et al. 1975, Comings u. Drets 1976). Auch wird eine Beteiligung spezifischer Basensequenzen (Comings u. Drets 1976, Comings et al. 1978) und von Histonen (Selander u. de la Chapelle 1973) oder Nicht-Histon-Proteinen (Comings 1978) am Q-Bandenmechanismus diskutiert.



Abb. 2 Q-(uinacrin) Bandenfärbung menschlicher Metaphase-
chromosomen mit deutlicher Fluoreszenz des Y-Chromosoms
(Methode nach Caspersson)

2.2.4.2. Die C(entromer)-Bandentechnik (C-Banden) (Abb.3)

1970 berichteten Pardue und Gall von einer Zufallsbeobachtung. Sie gaben radioaktiv markierte Satelliten-DNS Mäusezellkulturen zu und verfolgten autoradiographisch den DNS-Einbau in das Mäusegenom. Während dieser "in situ Hybridisierung" wurden die Chromosomen unter anderem auch mit NaOH 0.7n und mit RNase behandelt. Bei anschließender Färbung mit Giemsa fiel die stärkere Färbung der zentromernahen Regionen auf, in welchen die Hybridisierung stattgefunden hatte.

Arrighi und Hsu 1971 leiteten von diesen Hybridisierungsexperimenten eine Färbemethode zur Darstellung des zentromernahen Heterochromatins ab, die umfangreiche und langwierige Vorbehandlungen mit Puffern, Säuren und Laugen erforderte. Eine Reihe von Modifikationen sind inzwischen bekannt geworden, die im wesentlichen zu einer Vereinfachung der Technik bei unverändertem Resultat geführt haben (Hsu 1973, Sumner 1972, McKenzie u. Lubs 1973).

Die wichtigsten C-Banden Techniken mit Angabe der Methodik sind in Tabelle 1 aufgeführt.

Mit C-Banden Techniken werden die zentromernahen Bereiche der Chromosomen stark angefärbt, ebenso das zentromernahe Heterochromatin am langen Arm der Chromosomen 1, 9 und 16, sowie der distale Abschnitt des langen Armes des Y-Chromosomes. Es können individuelle Variationen des C-Heterochromatins, Duplikationen und Defizienzen dargestellt und als Ursache von Längenunterschieden homologer Chromosomen ohne Krankheitswert nachgewiesen werden. Weitere Strukturveränderungen im zentromernahen Bereich, wie perizentrische Inversionen, können ebenfalls dargestellt werden. Eine Aufklärung des C-Bandenmechanismus ist trotz zahlreicher Untersuchungen bisher nicht gelungen (Comings et al.1973, Eiberg 1973, McKenzie u. Lubs 1973, Chuprewich et al.1973, Hsu 1974, Howell und Denton 1976, Drets et al.1978, Konsuwan u. Smyth 1978, Holmquist 1979).

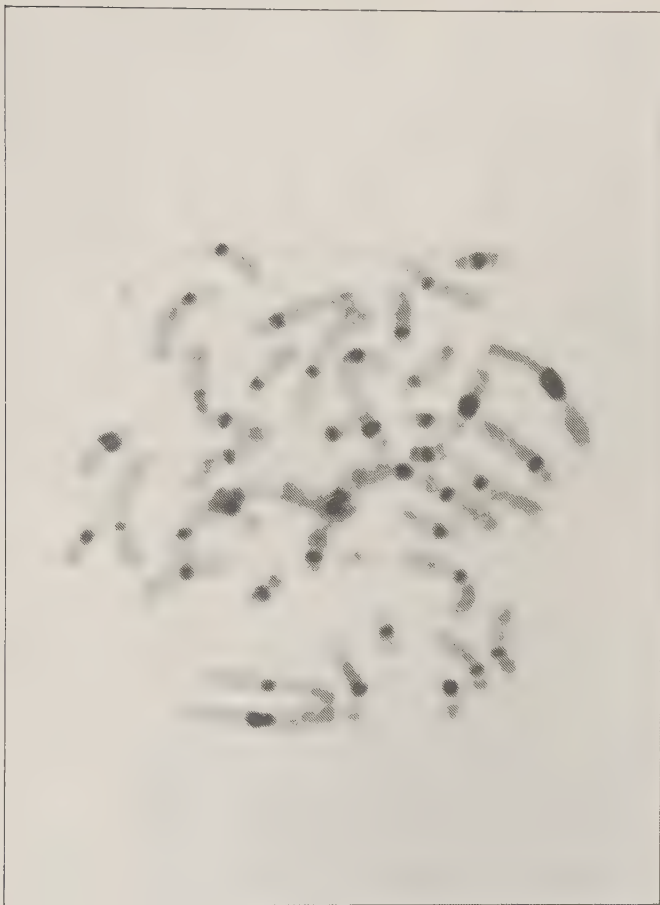


Abb. 3 C-(entromer) Bandenfärbung menschlicher Metaphase-
chromosomen (Methode nach Sumner)

Autoren	Präparate- trocknung	Vorbehandlung Inkubation d. Präp.	pH	Temp.	Zeit	Färbung Farbstoff	pH	Zeit
Arrighi Hsu 1971	Flamme	0,2n HCl RNase 0,07n NaOH 2xSSC		25°C 37°C 25°C 65°C	30 min 60 min 2 min 12-24 h	Giemsa	6,8	
Craig-Holmes Shaw 1971	Flamme	0,2n HCl 0,07n NaOH in 0,112 NaCl 2xSSC	7,0	25°C 65°C	15 min 60 sek	Giemsa	6,8	
McKenzie Lubs 1972	Heiz- platte	0,2 HCl 2xSSC	7,0	25°C 65°C	15 min 16-24 h	Giemsa	6,8	
Sumner 1972	Luft	0,2n HCl BaOH 2xSSC		20°C 50°C 60°C	60 min 5-15 min 60 min	Giemsa 2%	6,8	90 min
Alfi 1973	Flamme	0,0175n NaOH 12xSSC 70%, 95% Äthanol	7,0	100°C	5 sek 60 sek	Giemsa	6,6	15-30 min
Bobrow 1972	Luft			37°C		Giemsa 2%	11	10-20 min

Tab. 1 Centromer-Bandentechniken

2.2.4.3. Giemsa Banden-Färbung (G-Banden) (Abb.4)

Parallel zu den Versuchen, die zur Entwicklung von verschiedenen C-Banden Techniken führten, wurden 1971 Methoden entwickelt, die mittels Giemsa-Färbung lichtmikroskopisch sichtbare Banden auf den Chromosomen ergaben (Seabright 1971, Dutrillaux 1971, Schnedl 1971, Drets und Shaw 1971, Sumner 1971, Chauduri 1971, Lomholt u. Mohr 1971, Patil 1971).

Die verschiedenen G-Banden Techniken schließen Vorbehandlungsschritte ein, die in der Behandlung der Präparate mit Enzymen, Laugen oder erhitzten Pufferlösungen bestehen (Tab.1). Mittels dieser Techniken konnte eine charakteristische Verteilung hell und dunkel gefärbter Bezirke auf jedem Chromosom lichtmikroskopisch dargestellt werden. Dieses Bandenmuster zeigt eine weitgehende Übereinstimmung mit dem Fluoreszenzbandenmuster von Caspersson (Rowley u. Bodmer 1971).

2.2.4.4. R(everse)-Banden, T(elomer)-Banden (Abb.5)

1971 wurde von Dutrillaux eine Bandenmethode beschrieben, welche die bei Giemsa Banden-Färbung hellen Bereiche dunkel färbt und die dunklen Giemsa Banden ungefärbt läßt (Dutrillaux u. Lejeune 1971). Die Methode besteht im Wesentlichen aus einer Hitzedenaturierung der Chromosomen bei 86°C bis 87°C in Phosphatpuffer (Earl) bei pH 6,5 für 10 min und anschließender Färbung in Giemsa Farbstoff.

1973 veröffentlichte Dutrillaux eine modifizierte R-Bandenmethode, bei welcher nach Änderung des pH-Wertes während der Vorbehandlung von 6,5 auf 5,1 die terminalen R-Banden an jedem Chromosom dunkel gefärbt werden, während die übrigen Chromosomenabschnitte weitgehend ungefärbt bleiben. R- bzw. T-Banden bieten sich somit als Ergänzung zu G-Banden Techniken an, insbesondere dann, wenn Strukturveränderungen an den bei G-Banden hell gefärbten Chromosomenenden ausgeschlossen werden sollen.

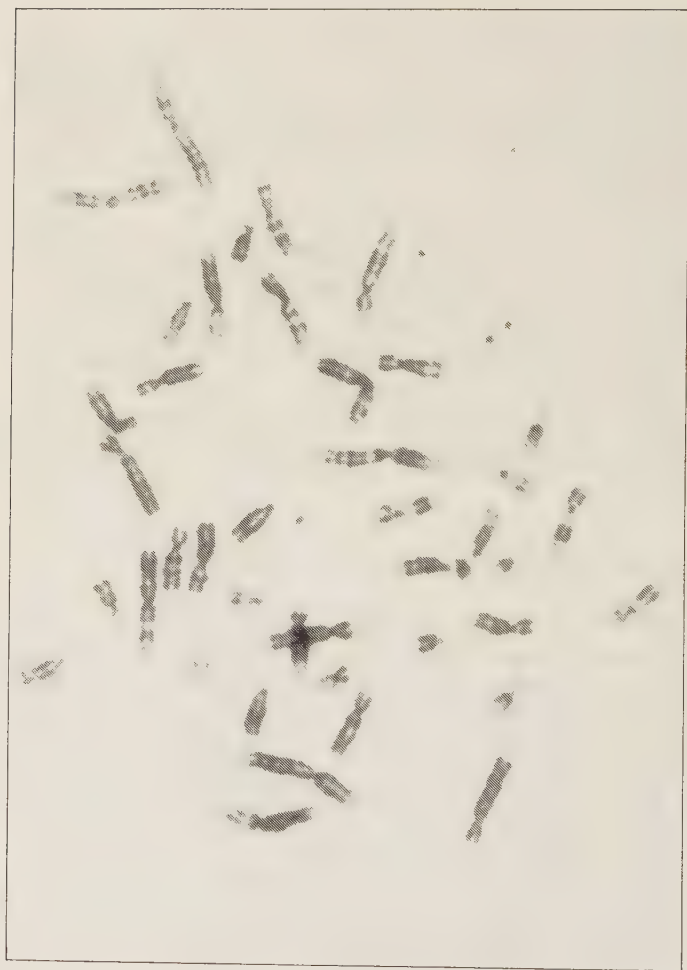


Abb. 4 G-(iems) Bandenfärbung menschlicher Metaphase-
chromosomen (Methode nach Walther 1974)

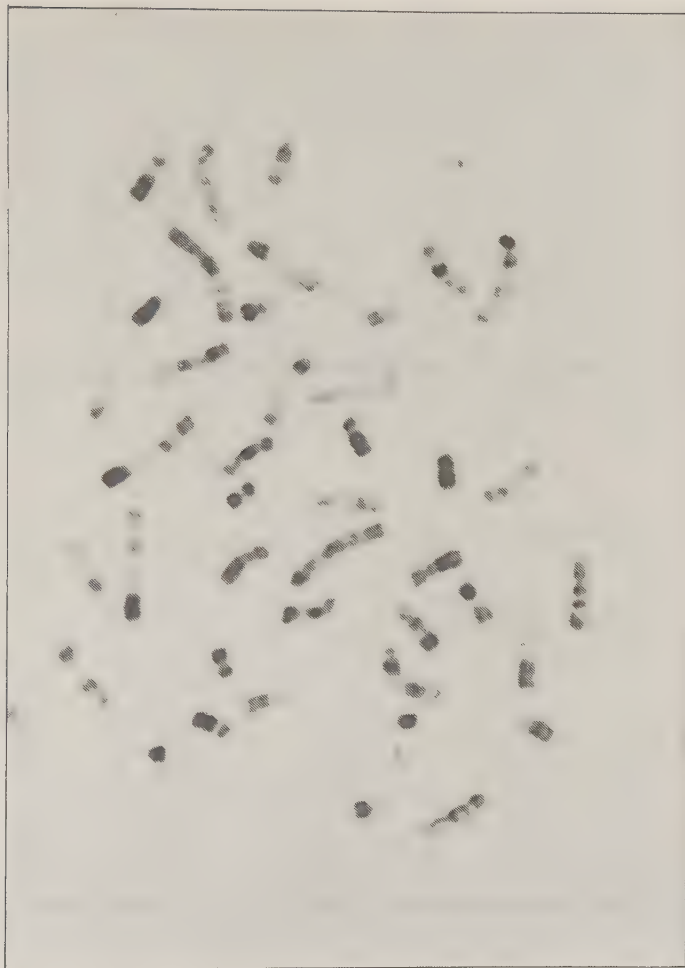


Abb. 5 R-(everse) Bandenfärbung menschlicher Metaphasechromosomen
(Methode nach Dutrillaux 1971)

Autoren	Präparate- trocknung	Vorbehandlung Inkubation d. Präp.	pH	Temp.	Zeit	Färbung Farbstoff	pH	Zeit
Schnedl 1971	Luft	0,07n NaOH Sörensen-Puffer	13 6,8	20°C 58°C	90 sek 24 h	Giensa 10% in Weise-Puffer	7,0	20 min
Drets, Shaw 1971	Flamme	0,07n NaOH in 0,112n NaCl 12xSSC	12 7,0	20°C 65°C	30 sek 72 h	Giensa 5%	6,6	5 min
Sumner 1971	Luft	2xSSC	7,0	60°C	60 min	Giensa 2% in Gurr-Puffer	6,8	90 min
Lomholt Mohr 1971	Luft	0,225 NaCl in 0,025 Nacitrat	7,4	70°C	3 h	Giensa 10%	7,0	20 min
Bhasin Förster 1972	Luft Flamme	4xSSC	7,0	65°C	100 min	Giensa 5% in McIlvain-Puffer	7,0	8 min
Shiraishi Yosida 1972		6M Harnstoff in Sörensen-Puffer	6,8	37°C	10 min	Giensa 2% in Sörensen-Puffer	6,8	20 min
Chauduri 1971		Sörensen-Puffer	6,8	64°C	24 h	Giensa 5% in Sörensen-Puffer		
Beil Limon 1975	Flamme	Cacodylate-Puffer	7,3	65°C	150 min	Giensa	6,8	

Tab. 2a Giensa-Bandentechniken, Vorbehandlung mit Laugen und/oder erwärmten Ionenlösungen

Autoren	Präparate- trocknung	Vorbehandlung Inkubation d. Präp.	pH	Temp.	Zeit	Färbung Farbstoff	pH	Zeit
Seabright 1971	Luft	Trypsin 0,25%	7,0	20°C	12 sek	Leishman 25%	6,8	4 min
Wang u. Fedo- roff 1972	Flamme	Trypsin 0,25-0,5%	7,0	30°C	15 min	Giemsa 10%	7,0	2 min
Dutrillaux 1971		Pronase 0,005%	7,0	37°C	3-6 min	Giemsa		
Yunis, San- chez 1973	Luft	a) 4% Formalin b) abs. Methanol c) Dehydrierung			1-2 h	Giemsa 1% Giemsa 1,25% 0,13M Phosph.-Puff. Giemsa 1%	6,7	
Patil 1971	Heiz- platte	keine				Giemsa 2% in 0,002 8M Na ₂ HPO ₄	9,0	5 min
Sperling 1972	Luft	keine				Leishman 25% in Sörensenpuffer u. Trypsin 0,0005%	6,8	20min
Walther 1974	Luft	keine				Leishman in 1/15M Sörensenpuffer	6,8	20min

Tab. 2b Giemsa-Bandentechniken, Vorbehandlungen mit Enzymen, andere oder keine Vorbehandlungen

2.2.4.5. Feulgen-Banden

Die Feulgen-Färbung und die Feulgen-Fluoreszenzfärbung (Nitsch et al. 1970) zeigen an nicht speziell vorbehandelten Chromosomen eine gleichmäßige Anfärbung.

Rodman u. Tahiliani 1973 beschrieben eine Methode, bei welcher nach umfangreicher Vorbehandlung mittels herkömmlicher Feulgen-Färbung ein Bandenmuster produziert wurde, das dem G-Bandenmuster ähnelt, jedoch nicht völlig mit ihm identisch ist (Tab. 3).

2.2.4.6. N-Banden, NOR-Färbung (Tab. 3)

Matsui u. Sasaki 1973 fanden, während experimenteller Arbeiten über den G-Bandenmechanismus, daß Metaphasechromosomen nach Vorbehandlung mit Trichloressigsäure und HCl nach Färbung mit Giemsa eine charakteristische Anfärbung der Satelliten zeigen. Eine vergleichende Untersuchung bei anderen Spezies ergab, daß es sich um eine Anfärbung der Nukleolus organisierenden Regionen (ribosomale DNS) handelt, da sich z.B. bei der Känguruhratte die sekundäre Konstriktion des X-Chromosoms anfärbt, die als die Nukleolus organisierende Region nachgewiesen ist (Funaki et al. 1975). Außerdem wird der Nukleolus des Interphasekerns angefärbt.

Goodpasture und Bloom 1975 veröffentlichten eine vereinfachte Färbemethode der Nukleolus organisierenden Region. Sie besteht aus einer Vorbehandlung mit Silbernitrat und Ammoniumhydroxyd. Anschließend wird mit Formalin entwickelt. Nach dem Einbetten werden die NOR-Banden im Lichtmikroskop untersucht. Die Ergebnisse sind identisch mit der NOR-Färbung von Matsui 1973.

Autoren	Präparate- trocknung	Vorbehandlung Inkubation d.Präp.	pH	Temp.	Zeit	Färbung ~ Farbstoff	pH	Zeit
Reverse-Banden								
Dutrillaux Lejeune 1971		Phosphatpuf. 20mM (Earl)	6,5	87°C	10 min	Giensa 4%	6,7	
Telomer-Banden								
Dutrillaux 1973		Phosphatpuf. 20mM (Earl)	5,1	87°C	10 min	Giensa 3% in Phosphatpuffer	6,7	5-30 min
Feulgen-Banden								
Rodman Tahiliani 1973		0,14 M Phosphatpuf. 6xSSC 12xSSC Methano/Eisessig 3/1 1n HCl	10 7,0	20°C 20°C 60°C	18 min 60-72h 5-10min 12 min	Feulgen Reag.		
Nukleolus organis. Region = NOR-Färbung								
Matsui Sasaki 1973		5% Trichloressigs. 0,1 n HCl Phosphatpuffer		88°C 60°C	30 min 30-45 min			
Bloom Good- pasture 1976	Luft od. Flamme	feuchte Kammer 50% AgNO ₃	4,5- 5,0	50°C	15 min	4Tr. ammonakal. Silbernitratl.+ 4Tr. Formalin3%	4,5	30 sek - 5 min

Tab. 3 R-Banden-, T-Banden-, Feulgen-Bandentechniken und NOR-Färbung

2.2.5. Nomenklatur der Chromosomenbanden

1971 wurde auf einer Konferenz in Paris eine Nomenklatur und ein Schema der Bandenfärbungen dargestellt (Paris Konferenz 1971, Hamerton 1973) (Abb. 6).

Auf einer Folgekonferenz (Paris Suppl. 1975) wurden die G-Banden-Schemata korrigiert (Abb.7). Mittels dieser Nomenklatur wurde eine einheitliche Bezeichnung von chromosomalen Veränderungen (z.B. Translokationen, Deletionen, Duplikationen usw.) nebst einer genauen Bezeichnung eventueller Bruchpunkte möglich gemacht.

2.2.6. Phylogenetische und funktionelle Gesichtspunkte der Chromosomenbanden

Vergleichende Bandenuntersuchungen haben gezeigt, daß verschiedene Tier- bzw. Pflanzenarten innerhalb einer Art ein eigenes, charakteristisches Bandenmuster aufweisen. Innerhalb näher verwandter Arten ist ein ähnliches Bandenmuster festzustellen (ausführlicher Überblick in H.N.Seuanez "The Phylogeny of Human Chromosomes").

Innerhalb eines Individuums findet man in der Regel in verschiedenen Geweben identische Bandenmuster. Treten dennoch in verschiedenen Geweben verschiedene Karyotypmerkmale auf, spricht man von Mosaiken, die in der Regel postzygotisch entstanden sind.

Trotz der unterschiedlichen Funktion der Chromosomen in Mitose und Meiose weisen mitotische und meiotische Chromosomen identische Bandenmuster auf (Okada u. Comings 1974, Luciani et al.1975). Sie sind daher als elementare Strukturen des genetischen Materials anzusehen.

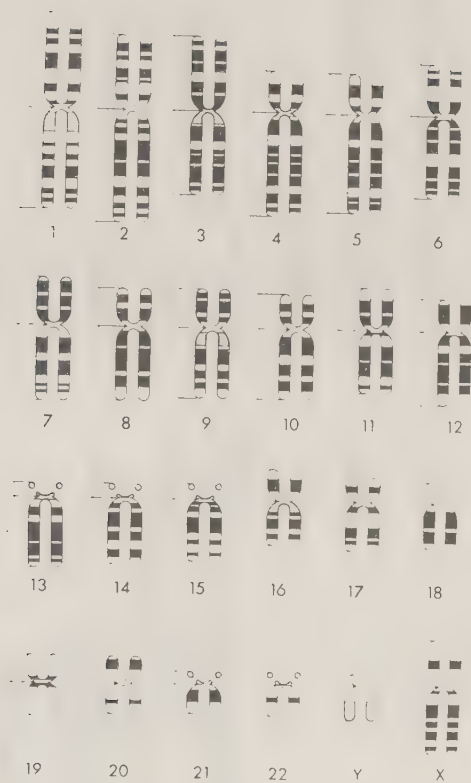


Abb. 6 Schematische Darstellung der Chromosomen nach der Paris-Nomenklatur 1971



Abb. 7 Schematische Darstellung der Chromosomen nach der
Paris Folgekonferenz 1975
HSA Homo sapiens

Im Zuge der Zellteilung formen sich die Chromatinfäden zu extrem kondensierten Chromosomen der Telophase, an denen man keine G-Banden beobachten kann (Seabright 1975).

Im normalen Chromosomenpräparat kommen neben Chromosomen der Metaphase auch vereinzelt Chromosomen der Prometaphase vor (Yunis et al. 1975). Sie beschrieben 1978 eine Technik die mittels Synchronisation von Lymphozytenkulturen eine wesentlich höhere Ausbeute an Zellen bringt, die sich in der Prometaphase befinden. Diese Technik ermöglicht die Analyse von sogenannten "high resolution" G-Banden Chromosomen. Es zeigte sich, daß sich einzelne Chromosomenbanden des Paris-Schemas zu einem früheren Zeitpunkt der Mitose in mehrere Unterbanden aufteilen lassen (Abb.8). Diese Methode ermöglicht auf der einen Seite eine genauere Analyse von Strukturveränderungen und stellt auf der anderen Seite einen Beitrag zur Aufklärung der Chromosomenstruktur dar (Franke u. Oliver 1978).

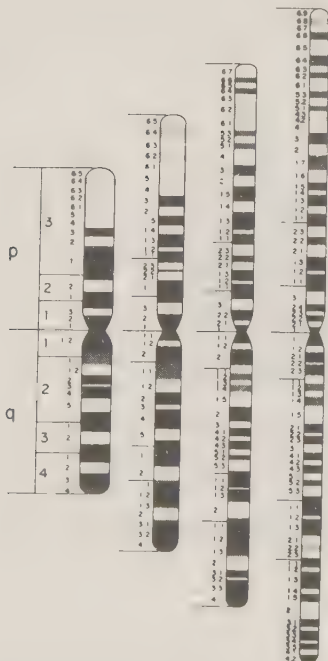


Abb. 8
G-Banden Schema des Chromosoms Nr.1 zu unterschiedlichen Zeitpunkten in der Mitose; aus Yunis et al.1978

2.3. Befunde zur Chromosomenstruktur

2.3.1. Nukleinsäuren (aus Habers 1975)

Die Nukleinsäuren wurden 1871 von Miescher entdeckt. Die Struktur der Doppelhelix (Abb 9b) wurde 1963 von Watson und Crick aufgedeckt. (Übersicht bei Watson 1969).

2.3.1.1. Struktur der DNS (Abb.9) (Übersicht bei Nagl 1976)

Die DNS besteht aus einer linearen, unverzweigten Aneinanderreihung von einzelnen Nukleotiden. Jedes Nukleotid setzt sich aus einem Molekül Phosphorsäure, einem Molekül Zucker und einer Base zusammen. Bei der DNS kommen die Purinbasen Adenin und Guanin und die Pyrimidinbasen Thymin und Cytosin vor. Die Zuckermoleküle der Nukleotide sind mittels Phosphatbrücken miteinander verknüpft und bilden so den Einzelstrang der DNS. Die spezifische Basenfolge stellt den Informationsgehalt der DNS dar. Durch Bindung der Nukleotidbasen mit ihren korrespondierenden Basen mittels Wasserstoffbrücken (Adenin mit Thymin und Guanin mit Cytosin) und gleichzeitige Wendelung entsteht die bekannte Struktur der DNS Doppelhelix.

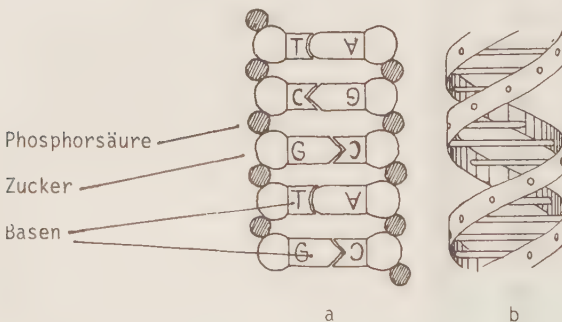


Abb. 9 Primär-(a) u. Sekundärstruktur (b) der DNS (aus Daumer 1977)

2.3.1.2. Differenzierung der DNS mit biochemischen Methoden

Die DNS von höheren Lebewesen kann mit verschiedenen biochemischen und cytogenetischen Methoden in verschiedene Gruppen eingeteilt werden, die für das Verständnis der Bandenentstehung von Bedeutung sein können.

Erwärmt man eine DNS-Lösung bei neutralem pH, so tritt eine Wärmedenaturierung ein, die eine Änderung der DNS-Struktur bewirkt. Die beiden korrespondierenden DNS-Stränge trennen sich (sie "schmelzen"). Der Schmelzpunkt liegt bei ca. 70° bis 80°C. Der Schmelzpunkt ist abhängig von der Molarität des Lösungsmittels, vom pH und von der Basenzusammensetzung der DNS. Die größere Festigkeit der Bindung von Guanin und Cytosin (drei Wasserstoffbrückenbindungen) gegenüber der geringeren Festigkeit von Adenin und Thymin (zwei Wasserstoffbrückenbindungen) bewirkt, daß mit zunehmendem GC-Gehalt der Schmelzpunkt ansteigt, was eine Differenzierung von GC-reicher und AT-reicher DNS ermöglicht.

Bei langsamer Abkühlung renaturiert die DNS wieder weitgehend, d.h. die Einzelstränge fügen sich wieder zu einem Doppelstrang zusammen (Basenpaarung). Bei rascher Abkühlung findet keine Renaturierung mehr statt. Die DNS liegt dann in verknäulten, nicht basengepaarten Einzelsträngen vor. Die Renaturierungsgeschwindigkeit beim Abkühlen ist abhängig von der Basensequenz. Sehr schnell renaturiert hochrepetitive DNS, sie besteht aus kurzen, sich fortlaufend wiederholenden DNS-Sequenzen. Langsamer renaturiert mäßig repetitive DNS, die aus Wiederholungen längerer DNS-Sequenzen besteht. Am langsamsten renaturiert einmalige, nicht repetitive DNS.

Aufgrund unterschiedlicher Anfärbarkeit unterschied Heitz 1928 euchromatische und heterochromatische Zellkernbezirke. Dieser morphologisch, zytochemischen Unterteilung liegen biochemisch nachweisbare Unterschiede zu Grunde. Euchromatin und Heterochromatin können mit biochemischen Methoden getrennt und auf den Gehalt an unterschied-

lichen DNS-Klassen untersucht werden. Comings und Matoccia 1972 fanden im Interphaseheterochromatin von Wirbeltieren folgende DNS-Klassen:

- I. hoch repetitive Satelliten-DNS,
teils AT-reich, teils GC-reich,
- II. repetitive DNS,
- III. nicht repetitive DNS.

2.3.1.3. Unterschiedliche Verteilung verschiedener DNS-Klassen auf den Metaphasechromosomen

Hoch repetitive DNS ist vorwiegend im zentromernahen Bereich der Chromosomen lokalisiert (Arrighi et al. 1970, Hsu et al. 1972) und in den Satellitenregionen der akrozentrischen Chromosomen (Jones et al. 1973, Jones et al. 1974). Gosden et al. 1975 fanden, daß die verschiedenen Satelliten-DNS Fraktionen in den zentromernahen Regionen von unterschiedlichen Chromosomen lokalisiert sind.

Mittels Färbung mit Acridin Orange, das Einzelstrang-DNS rot und Doppelstrang-DNS grün anfärbt, kann cytochemisch Einzelstrang-DNS und Doppelstrang-DNS differenziert und die Lokalisation auf dem Chromosom bestimmt werden (De la Chapelle et al. 1973).

2.3.2. Chromosomale Proteine (Fellenberg 1974)

In höher organisierten Lebewesen liegt die DNS nicht nackt im Zytoplasma vor, wie beispielsweise bei Bakterien, sondern ist in der komplexen Struktur des Zellkerns organisiert. Zum Verständnis der Bandenentstehung ist die Kenntnis der chromosomalen Struktur unerlässlich. An Struktur und Funktion des Zellkerns sind chromosomale Proteine wesentlich beteiligt (Übersicht bei Elgin und Weintraub 1975).

Die chromosomalen Proteine lassen sich in zwei Gruppen einteilen:

- I. basische Proteine (Histone),
- II. saure Proteine (Nicht-Histon Proteine).

2.3.2.1. Histone

Beim Menschen findet man fünf Histonfraktionen, die sich im Laufe der Evolution kaum verändert haben (Tab.4).

Histonfraktion	Aminosäuren	Molekulargewicht	basische Aminosäuren
H1 (I, F1, KAP)	215	20000	sehr lysinreich
H2a (IIb1, F2a2, ALG)	129	14000	lysinreich
H2b (IIb2, F2b, KSA)	125	14000	lysinreich
H3 (III, F3, ARE)	135	15000	argininreich
H4 (IV, F2a1, GRK)	102	11000	argininreich

Tab. 4 Nomenklatur der Histone aus Fellenberg 1974

Eine Reihe von Untersuchungen setzte sich mit der Frage auseinander, ob die Histone gleichmäßig über das Chromosom verteilt sind oder ob Häufungen auftreten, die mit der Bandenentstehung in Zusammenhang stehen könnten. Durch Immunfluoreszenzuntersuchung konnte gezeigt werden, daß alle fünf Histone gleichmäßig über das gesamte Chromosom verteilt sind (Goldblatt u. Bustin 1975, Bustin et al.1976).

2.3.2.2. Nicht-Histon Proteine (saure chromosomale Proteine)

Im Gegensatz zu den Histonen stellen die Nicht-Histon Proteine keine einheitliche Gruppe dar. Ihr Molekulargewicht bewegt sich in der gleichen Größenordnung wie das der Histone, ihr pH-Wert reicht von neutral bis sauer. Die Auftrennung von Nicht-Histon Proteinen ist bisher nur unvollständig möglich. 10 bis 15 verschiedene Nicht-Histon Proteine machen mindestens 70% der gesamten Nicht-Histon Proteinfraction aus (Elgin u. Bonner 1972).

Über ihre Struktur, Vorkommen, Funktion und Verteilung auf dem Chromosom ist in der Literatur bislang kaum berichtet worden.

Man nimmt an, daß die Funktion der Nicht-Histon Proteine von Regulationsaufgaben bis zur Beteiligung an Chromosomenstruktur und Zellteilung reicht (Felsenfeld 1978).

Comings und Harris 1975 differenzierten die sauren chromosomalen Proteine. Eine weitere Untersuchung ergab eine unterschiedliche Verteilung der Nicht-Histon Proteine in Euchromatin (vermehrt Nicht-Histon Proteine) und Heterochromatin (vermindert Nicht-Histon Proteine) (Comings et al. 1977).

Pederson und Bhorje 1975 beschrieben eine spezielle Nicht-Histon Klasse, die an transskriptionsinaktive DNS eng gebunden ist.

Burkholder u. Weaver 1977 fanden bei Untersuchungen an Leberzellkernen, daß kondensiertes Chromatin für Nukleasen-Verdauung wesentlich weniger empfindlich ist, als nicht kondensiertes Chromatin von Leberzellkernen. Sie erklärten ihre Befunde durch eine stärkere Assoziation von Nicht-Histon Molekülen an kondensierte DNS.

2.3.3. Das Nukleosomenmodell - Feinstruktur und Aufbau des Chromatinfadens (Übersicht bei Kornberg 1977, Sonnenbichler 1979)

Olins und Olins 1974 fanden bei elektronenmikroskopischen Untersuchungen von isolierten eukaryontischen Zellkernen perlenartig geformte Nukleoproteinstrukturen, die sie ν -bodies oder Nukleosomen nannten. Sie stellen, wie "Perlen auf einem Strang", die elementare Untereinheit des Chromatins dar.

Durch Nuklease-Untersuchungen (Hewish u. Burgoyne 1973, Noll 1974, Sollner Webb u. Felsenfeld 1975) und röntgenspektrografische Untersuchungen gilt die Existenz der Nukleosomen heute als gesichert.

Die Nukleosomen sind aus vier Histonen H2a, H2b, H3 u. H4 zusammengesetzt. In vitro bilden sich nur dann Nukleosomen, wenn neben freier DNS diese vier Histone anwesend sind (Kornberg u. Thomas 1974).

Jeweils zwei Histone, nämlich H2a und H2b sowie H3 und H4 bilden Komplexe. Histon H1 bildet keine Komplexe (Lewis 1976, Hyde und Walker 1975, Burton et al. 1975, Weintraub et al. 1975).

Ein Nukleosom wird aus 8 Histonen (Oktamer) gebildet, wobei jedes der vier oben genannten Histone zweimal vorkommt (Li 1975). (Abb.10).

Um ein Nukleosom windet sich schleifenförmig der DNS Strang, der eine Länge von ca.140 Basenpaaren aufweist (Abb.11). Einzelne Nukleosomen, die Abmessungen von ca.110 x 110 x 57 Å aufweisen, werden durch freie DNS Abschnitte von durchschnittlich 60 Basenpaaren-Länge verbunden (Crick u. Klug 1975, Noll u. Kornberg 1977).

Diese Nukleo-Histon-Interaktion bewirkt eine ca. 1:7-fache Kondensation der DNS gegenüber dem nativen Strang (Sedat u. Manuelidis 1978). Dieser Nukleoproteinfaden besitzt einen Durchmesser von ca.100 Å.

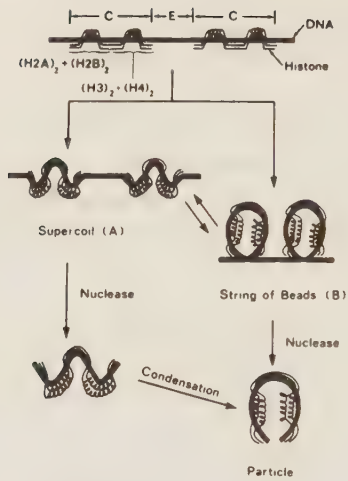


Abb. 10 Nukleosomenmodell aus Li 1975

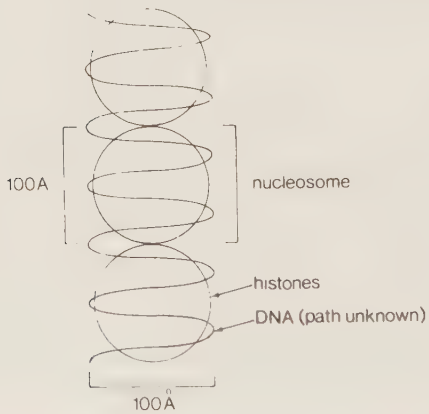


Abb. 11 Nukleosomenmodell aus Kornberg 1977

Eine weitere Kondensierung des Chromatinfadens wird durch Superwendelung des $100 \text{ \AA}$ Nukleoproteinfadens erreicht (Abb.12). Es entstehen dadurch Chromatinfäden mit einem Durchmesser von $300 \text{ \AA}$ (Übersicht bei du Praw 1970, Schwarzacher 1970, Lampert 1971, Rattner u. Hamkalo 1978, Hozier et al.1977, Worcel 1978).

Dem Histon H1 scheint bei dem Aufbau dieser Superstruktur eine entscheidende Rolle zuzukommen (Renz et al.1977, Renz et al.1978, Cole et al.1978). Die Entfernung von Histon H1 bewirkt eine Auflösung der $200\text{-}300 \text{ \AA}$ Struktur und führt wieder zur Bildung einer $100 \text{ \AA}$ Faser (Gaubatz et al.1978, Brasch et al.1972, Brasch 1976).

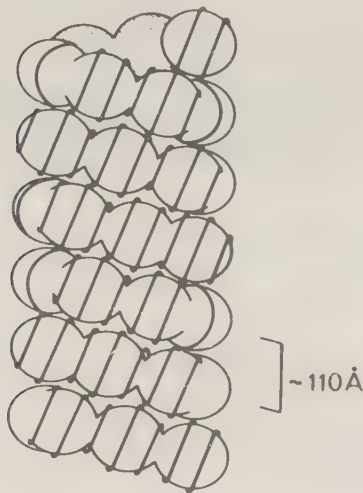


Abb. 12 "Solenoidales" Modell der $300 \text{ \AA}$ Nukleosomenfaser (Finch u. Klug 1976)

2.3.4. Anordnung des Chromatinfadens in Metaphasechromosomen

Elektronenmikroskopische Bilder von metallbedampften Metaphasechromosomen zeigen eine unregelmäßige Anordnung von 300 Å Fasern im ganzen Chromosom (Filip et al.1975, Mace et al.1977).

Nach herkömmlichen Präparationsmethoden können weder im normalen Elektronenmikroskop, noch im Rasterelektronenmikroskop Bandenstrukturen beobachtet werden (Filip et al.1975, Paulson u. Laemmli 1977, Wray et al.1978). Untersucht man jedoch Chromosomen elektronenmikroskopisch nach Vorbehandlung, wie sie für die lichtmikroskopische Darstellung von G-Banden üblich ist, kann man auch elektronenmikroskopisch G-Bandenstrukturen nachweisen.

Bei elektronenmikroskopischen Untersuchungen Giemsa-Banden gefärbter Chromosomen stellten sich die angefärbten Chromosomenregionen als Zonen vermehrter Chromatinkondensation dar (Ruzicka 1974a, 1974b).

Burkholder 1975 beobachtete elektronenmikroskopisch G-Banden nach Enzymverdauung mit Trypsin. Eine Verlängerung der Trypsinierungsdauer führte zu einer Zerstörung der Chromosomenstruktur.

Comings und Okada 1975 beobachteten elektronenmikroskopisch Bandenstrukturen an Hamsterchromosomen nach Vorbehandlung mit Aktinomycin ohne Methanol/Eisessigfixierung.

Bath 1976 stellte von trypsinierten Chromosomen Platin-Kohle Abdrücke her. Bei elektronenmikroskopischer Untersuchung stellten sich die Banden als Abschnitte dicht gepackter Chromatinfibrillen dar. Verlängerte Trypsinbehandlung führte zu kollabierten Chromosomen ohne erkennbare Bandenstruktur.

Sedat u. Manuelidis 1978 entwickelten ein Modell (Abb.13), das auf elektronenmikroskopischen und rasterelektronenmikroskopischen Untersuchungen beruht. Das Modell geht von dem bekannten 300 Å Faden aus, der durch zweimalige Superwendelung einen 2000 Å Faden bildet, der dann durch abermalige Superwendelung eine tubuläre Struktur von 6000 Å Durchmesser erstellt (Abb.13).

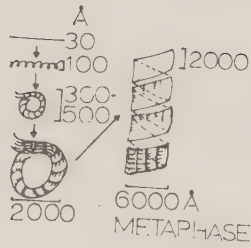


Abb. 13 Chromosomenmodell von Sedat u. Manuelidis 1978

Back u. Zeuthen 1978 isolierten Metaphasechromosomen, die während der Präparation desintegrierten. Jedes Chromosom verformte sich zu einem schlauchförmigen Gebilde von 4000 Å Durchmesser und einer Wandstärke von 300 Å, das mit Wasser gefüllt ist (Abb.14).

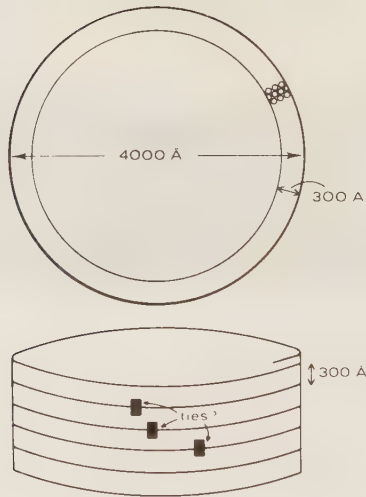


Abb. 14 Chromosomenmodell (Back u. Zeuthen 1978)

2.3.5. Zentrales Chromosomengerüst - ein Artefakt?

Es gibt Hinweise, daß die 300 Å Fasern, die von Histonen stabilisiert sind, an einem Chromosomengerüst aus Nicht-Histon Proteinen fixiert sind.

Sonnenbichler und Bornkamm 1967, Sonnenbichler und Nobis 1968 veröffentlichten Befunde über die Isolierung eines Residualkomplexes nach Ablösung aller Histone von Kalbsthymuschromatin, der aus DNS, RNS und zu 30 - 40% aus basischen Nicht-Histon Proteinen besteht. Es fiel eine äußerst starke Protein-DNS-Bindung auf. Elektronenmikroskopische Untersuchungen ergaben (Sonnenbichler 1969) eine rosettenartige Anordnung der DNS, in deren Zentrum die Residualproteine vermutet wurden.

Ähnliche DNS-Rosetten, die aus DNS-Schleifen bestehen, die von einer zentralen Proteinstruktur ausgehen und zusätzlich durch DNS-Brücken miteinander verbunden sind, beobachteten Comings und Okada 1976 und Okada und Comings 1979.

Comings 1978 versucht in einem Chromosomenmodell (Abb.15) elektronenmikroskopische Befunde und das Phänomen der Chromosomenbanden zu vereinen. Der 250-300 Å Faden kondensiert rosettenartig in Chromomerbanden und Interbanden. Diese rosettenartige Zusammenlagerung wird durch Proteine (Nuklear Matrix) bewirkt, die im Zentrum der Rosetten angeordnet sind. Zusammenlagerung der Chromomere führt dann zu G-Banden, weitere Kondensierung zu kompakten unbebandeten Chromosomen.

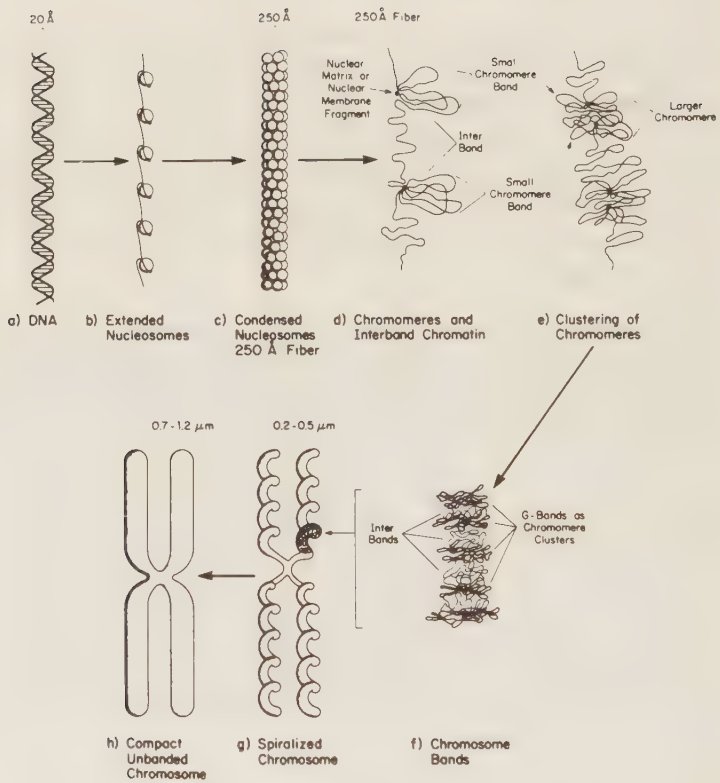


Abb. 15 Modell der Chromosomenstruktur höherer Wirbeltiere
aus Comings 1978

Adolph, Cheng und Laemmli 1977 zeigten, daß HeLa Metaphasechromosomen eine hoch organisierte Struktur besitzen, die nach Ablösung aller Histone und der meisten Nicht-Histone zurückbleibt. Das sogenannte Skelett (backbone) besteht aus Nicht-Histon-Proteinen und scheint an der Organisation der Chromosomen wesentlich beteiligt zu sein. Elektronenmikroskopische Untersuchungen der gleichen Arbeitsgruppe (Paulsen u. Laemmli 1977) zeigten, daß von Histonen befreite Metaphasechromosomen ein zentrales Gerüst besitzen, das der charakteristischen Form eines Metaphasechromosoms ähnelt und von DNS umgeben ist. Die DNS ist in Form vieler Schleifen angeordnet, wobei jede Schleife ihren Anfang und Endpunkt dicht beisammen am Proteinskelett hat (Abb. 16). Der weitere Verlauf der DNS innerhalb des Proteinskeletts ist nicht zu erkennen.

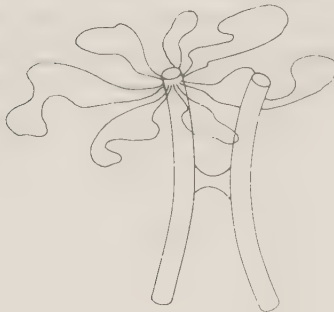


Abb. 16 Chromosomenmodell von Laemmli et al. 1978

Bestätigt wurden diese Resultate durch elektronenmikroskopische Arbeiten von Wray et al. 1978.

Einen weiteren Hinweis für die Existenz des zentralen Skeletts der Chromosomen ergaben die Untersuchungen von Howell u. Hsu 1979, die nach hypotoner Vorbehandlung mit 0,075 M KCl für 50 min ein Skelett in Metaphasechromosomen mittels Silberfärbung anfärben konnten. Die Nukleolus organisierende Region und die Kinetochore wurden ebenfalls angefärbt. Voraussetzung für eine erfolgreiche Anfärbung des Skeletts ist die Entfernung einer nicht näher definierten äußeren Chromatinschicht von dem Chromosom, was durch eine hypotone Vorbehandlung erreicht wird, wie sie bei keiner G-, C- oder R-Bandenmethode üblich ist.

Einer italienischen Arbeitsgruppe gelang kürzlich der Nachweis von kontraktilen Proteinen, nämlich Aktin und Myosin, im zentralen Gerüst meiotischer Chromosomen (Capana et al. 1980).

Von Okada und Comings 1980 wurde allerdings vermutet, daß es sich bei dem von Laemmli et al. 1978 beobachteten Chromosomenskelett um ein Artefakt handelt, das durch präparativ bedingte Aggregation von Nicht-Histon-Proteinen im Zentrum der Chromosomen entsteht. Bei eigenen elektronenmikroskopischen Untersuchungen an deproteinisierten Metaphasechromosomen fanden Okada und Comings kein zentrales Chromosomenskelett.

2.4. Einfluß von Präparationsschritten auf die Chromosomenstruktur und ihre mögliche Bedeutung für die G-Bandenentstehung

2.4.1. Hypotonie und Fixierung

Für eine erfolgreiche Bandendarstellung sind Vorbehandlungen mit einer hypotonen Lösung (in der Regel 0,075 M KCl) und anschließende Fixierung (in der Regel Methanol-Eisessig 3:1) Voraussetzung. Durch die hypotone Behandlung kommt es zu einer Wasseraufnahme der Zellen, es kommt zu keiner Ablösung von chromosomalen Proteinen (Fellenberg 1974). Essigsäurehaltige Fixative fällen die DNS aus und lösen vom Chromatin Histone ab. Die Dauer der Fixation scheint keinen Einfluß auf das Ausmaß der Histonablösung zu haben (Dick u. Johns 1968). Über das Ausmaß der Histonablösung sind unterschiedliche Resultate veröffentlicht worden (Tab.5).

Autor	untersuchtes Material	Fixation	Histonablösung
Dick u. Johns 1968	Kalbsthymuschromatin	45% Essigsäure	55% aller Histone vorwiegend H1, H2a
	Kalbsthymuschromatin	Methanol-Eisessig 3:1	ca. 7-8% des Histongehalts
Siwak und Wolmann 1974	Ratten- u. Mäuse-embryofibroblasten	Methanol-Eisessig 3:1	90% aller Histone
Brody 1974	kult. Mäusezellen	Methanol-Eisessig 3:1	80% aller Histone H1, H2b bleiben teilw. gebunden
Retief u. Rütchel 1977	kult. Mäusezellen	Methanol-Eisessig 3:1	H1 gesamt, Teile von H2a, H2b, H3, H4

Tab. 5 Ablösung der Histone vom Chromatin mit unterschiedlichen essigsäurehaltigen Fixativen

Pothier et al. 1975 und Bustin et al. 1976 untersuchten die Histonablösung durch Methanol/Eisessig 3:1 von Metaphasechromosomen mittels Immunfluoreszenztechniken und kamen ebenfalls zu unterschiedlichen Ergebnissen. Während Pothier et al. 1975 nach Methanol/Eisessig-Fixierung eine unvollständige Ablösung von Histonen beobachteten, fanden Bustin et al. 1976, daß durch Methanol/Eisessig-Fixierung alle Histone von den Chromosomen abgelöst worden waren.

Phasenkontrastmikroskopische und interferenzmikroskopische Untersuchungen an fixierten, sonst unbehandelten Chromosomen brachten unterschiedliche Ergebnisse.

McKay 1973 beobachtete an Äthanol-Eisessig 3:1 fixierten Chromosomen im Phasenkontrastmikroskop G-Banden-ähnliche Strukturunterschiede. Sumner et al. 1973 und Blakey und Filion 1976 beobachteten dagegen im Phasenkontrastmikroskop und Interferenzmikroskop keine Struktur-differenzierung auf unbehandelten, fixierten Chromosomen und schlossen daraus, daß das chromosomale Material gleichmäßig auf den Chromosomen verteilt ist.

Ross und Gormley 1973 untersuchten die Oberflächenstruktur von Methanol/Eisessig fixierten Metaphasechromosomen und konnten keine bandenähnliche Gliederung der Chromosomenoberfläche finden.

2.4.2. Einfluß von Vorbehandlungsschritten der G-Bandenmethoden

G-Bandenfärbungen können nach unterschiedlichen Vorbehandlungsschritten erzielt werden. Zur Vorbehandlung der Präparate werden Enzyme, alkalische Lösungen oder erhitzte Pufferlösungen verwendet. Nach Vorbehandlung mit Säuren werden keine G-Banden beobachtet (Kato u. Moriwaki 1972).

2.4.2.1. Enzyme

Behandlung von Methanol/Eisessig 3:1 fixierten Lymphozyten mit Trypsin 2% führte nach 30 min zu 10% Gewichtsverlust. Es kam zu keinem DNS-Verlust, was photometrisch anhand der mit Giemsa gefärbten Lymphozytenkerne bestimmt wurde (Sumner et al. 1973).

Sehested 1973 nahm an, daß eine nicht enzymatische Wirkung des Trypsins an der G-Bandenentstehung beteiligt sein könnte, da er nach Vorbehandlung mit hitzeinaktiviertem Trypsin ebenfalls G-Bandenfärbungen erzielen konnte.

Dev et al. 1972 vermuteten, daß eine komplexbildende Eigenschaft des Trypsins, insbesondere die Fähigkeit Ca^{++} Ionen zu binden, an der G-Bandenentstehung ursächlich beteiligt sein könnte.

Korf et al. 1976 zeigten dagegen, daß die G-Bandenentstehung von der Trypsinaktivität abhängt und nicht von der Calcium bindenden Eigenschaft des Trypsins. Nach Vorbehandlung mit inaktiviertem Trypsin konnten keine G-Banden erzielt werden.

Schuh et al. 1975 beobachteten während einer 25minütigen Behandlung mit Trypsin die Chromosomenmorphologie und fanden ein Anschwellen der Chromosomen. Sie maßen dieser Trypsin induzierten Chromosomenschwelung eine entscheidende Bedeutung in der G-Bandenentstehung bei.

2.4.2.2. pH, Temperatur und Ionenkonzentration

Gormley u. Ross 1972 und Ross u. Gormley 1973 fanden während der Pufferinkubation (SSC) eine Schwellung der Chromosomen und einen "Kollaps" der Chromosomenstruktur. Er verstärkt sich mit zunehmendem pH. Bei einem pH unter 2,6 dagegen erlangen die Chromosomen ihre normale Morphologie wieder (Gormley u. Ross 1976).

McKay 1973 beobachtete ebenfalls einen "Kollaps" der Chromosomenstruktur von Metaphasechromosomen zu Beginn der Giemsa-Färbung ohne Vorbehandlungen. Der Kollaps trat auch bei Behandlung von Metaphasechromosomen mit destilliertem Wasser und mit 0,1 M EDTA auf. Der Kollaps könnte, nach Meinung des Autors, durch die Entfernung von zweiwertigen Kationen (durch EDTA) vom Chromatin verursacht werden, da eine Inkubation von kollabierten Metaphasechromosomen in einer Lösung zweiwertiger Kationen (CaCl_2 , 0,01 M) wieder zu einer normalen Chromosomenstruktur führt.

Schnedl 1973 untersuchte nach autoradiographischer Markierung der chromosomalen DNS den DNS-Verlust bei bestimmten Vorbehandlungen zur G-Bandendarstellung. Geringe NaOH-Konzentrationen (0,07 M) verursachten einen DNS-Verlust von weniger als 5%. Behandlung mit Sörensenpuffer 1/15 M pH 6,8 verursachte bei Zimmertemperatur keinen DNS-Verlust. Bei Temperaturen zwischen 70⁰ und 100⁰ C kam es dagegen zu einem 50-70%igen DNS-Verlust innerhalb von 8 min. Vorangegangene NaOH-Behandlung 0,07 M vergrößerte den DNS-Verlust erheblich.

Sumner und Evans 1973 behandelten Methanol-Eisessig 3:1 fixierte Lyphozytenkerne mit verschiedenen, bei der ASG-G-Bandenmethode verwendeten Lösungen. Nach anschließender Färbung mit Giemsa wurde mittels photometrischer Messung der DNS-Verlust errechnet. 60 min Behandlung mit 2xSSC, 0,02 N HCl oder 4 M NaCl führte zu keinem DNS-Verlust.

Comings et al. 1973 behandelte fixierte und radioaktiv markierte Hamsterchromosomen mit unterschiedlichen, bei G-Bandenmethoden üblichen Vorbehandlungsschritten. Behandlung mit 0,07 N NaOH führte bei Zimmertemperatur mit zunehmender Inkubationszeit (z.B. 30 min) zu zunehmender Extraktion von DNS (50%) und Protein (30%). Behandlung mit destilliertem Wasser führte zu keiner nachweisbaren Extraktion von DNS und Protein. Behandlung mit SSC Puffer führte, je nach Konzentration, Dauer und pH, zu unterschiedlicher Extraktion von DNS und Protein (4-30% DNS-Verlust, 7-24% Protein-Verlust).

Bei der G-Bandentechnik von Schnedl 1971 (Tab.2) kam es zu 64% DNS-Verlust und 25% Protein-Verlust.

Die G-Bandentechnik von Drets und Shaw 1971 (Tab.2) führte zu 8,2% DNS-Verlust und zu 12% Protein-Verlust.

Die G-Bandenmethode von Patil 1971 (Tab.2) führte zu 1% DNS-Verlust und zu 3% Protein-Verlust.

Franke et al. 1973 konnte die Ergebnisse von Comings et al. 1973 bestätigen. Bei Säurefixierung mit Methanol/Eisessig kam es an isolierten Zellkernen zu ausgeprägten Proteinverlusten, während DNS in erster Linie bei Alkali- und Pufferbehandlung verloren ging.

2.4.3. Einfluß des Farbstoffes auf die Chromosomen

2.4.3.1. Struktur und Zusammensetzung von Giemsa- und Leishman-Farbstoffen (Thiazin, Romanowsky Farbstoffe).

Sie bestehen aus den chemisch definierbaren Komponenten Eosin, Methyleneblau und seinen Oxidierungsprodukten Azur, A, B und C (Abb.17).

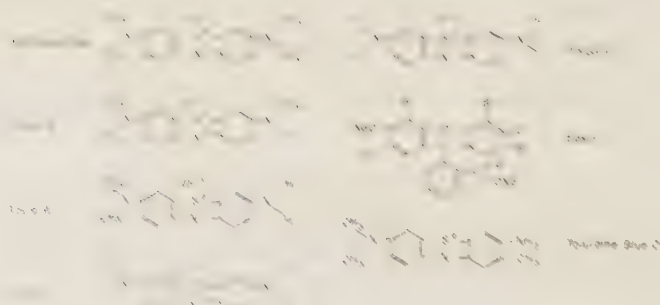


Abb. 17 Strukturformeln der Thiazin Farbstoffe aus Comings 1970

Der Leishman Farbstoff unterscheidet sich vom Giemsa Farbstoff durch einen hohen Anteil an stärker oxidiertem Methylenblau (Comings 1975).

Die Einzelkomponenten des Farbstoffs sind im Handel erhältlich, weisen jedoch in größerem Umfang Verunreinigungen durch Oxydationsprodukte auf (Marshall u. Lewis 1974), weil Methylenblau leicht oxidiert und in Azur A, B, C umgewandelt wird.

Besonders intensive G-Bandenfärbung wurde von dem Oxydationsprodukt des Methylenblaus, das unter dem Namen Methylene Violet Berninsen im Handel ist, beschrieben (Curtis u. Horobin 1975).

Eine Auftrennung der Thiazinfarbstoffgemische in die Einzelsubstanzen ist möglich, bereitet jedoch methodische Schwierigkeiten (Löhr et al. 1974).

Eine genauere Angabe zur Zusammensetzung von Giemsa und Leishman Farbstoffen war auch von der Firma Merz nicht zu erhalten (Merz 1975, 1977), da es keine synthetisch hergestellten Farbstoffe sind.

Die Thiazingemische verhalten sich nur in sehr geringen Konzentrationen nach dem Beer'schen Gesetz, nach welchem die Extinktion im Photometer mit steigender Konzentration der untersuchten Flüssigkeit linear zunimmt (Galbraith et al. 1979). Bei höheren Farbstoffkonzentrationen kommt es zu einem Abweichen vom Beer'schen Gesetz, die Extinktion nimmt ab, und die maximale Extinktion verschiebt sich zu niedrigeren Wellenlängen (Metachromasie), was durch eine Farbstoffaggregation auffällt (Rabinowitch u. Epstein 1941). Methylenblau hat beispielsweise seine maximale Extinktion bei 660 nm, bei einer Konzentration von $3 \times 10^{-6} \text{ M}$, bei der höheren Konzentration von $3 \times 10^{-4} \text{ M}$ liegt dagegen die maximale Extinktion bei 600 nm.

Diese spektrophotometrisch nachweisbaren Veränderungen der Thiazinfarbstoffe bei höheren Farbstoffkonzentrationen können durch eine Aggregation (Polymerbildung) von Farbstoffmonomeren erklärt werden (Comings 1975, Comings u. Avelino 1975).

Im Gegensatz zu Methylenblau und seinen Oxydationsprodukten Azur A, B und C zeigt Eosin, das ebenfalls Bestandteil von Giemsa und Leishman Farbstoffen ist, keine Metachromasie. Mit Eosin allein konnten bisher keine G-Banden angefärbt werden, was mit Methylenblau, Azur A, B und C allein möglich ist (Comings 1975).

2.4.3.2. Bindung des Farbstoffes an das Chromatin

Comings u. Avelino 1975 untersuchten die Bindungsstärke des Farbstoffes an die DNS mittels Gleichgewichtsdialyse. Bei einer Methylenblaukonzentration von 10^{-5} M betrug der Quotient Mol gebundener Farbstoff/Mol DNS $r=1$, das heißt, alle Phosphatgruppen der DNS waren mit Farbstoff abgesättigt. Da der Farbstoff in dieser Konzentration in einer polymeren Form vorliegt, halten sie eine Seit-an-Seit Anlagerung (side stacking) des Farbstoffes an die DNS für wahrscheinlich. Eine interkalare Bindung (d.h. eine Einlagerung des Farbstoffes zwischen korrespondierende Basenpaare dürfte aufgrund der Größe der Farbstoffpolymere unmöglich sein.

Gab man dem Versuchsansatz eine Salzlösung zu, z.B. KCl 0,05 M, so banden die Kaliumionen an negativen Phosphatgruppen der DNS. Es mußte nun eine höhere Farbstoffkonzentration aufgewendet werden, um die Kaliumionen zu verdrängen und um eine Neutralisation aller Phosphatgruppen der DNS durch Farbstoffmoleküle zu erreichen. Dieser Befund spricht für das Überwiegen von Ionenbindungen zwischen DNS und Farbstoff.

Ersetzte man fixiertes Chromatin durch unfixiertes (natives) Chromatin, so stellte sich heraus, daß nur die Hälfte aller Phosphatgruppen für die Bindung mit Farbstoff zur Verfügung stand. Fixierung von Chromatin mit Methanol/Eisessig 3:1 führte durch Entfernung von Proteinen zu einer Erhöhung der Bindungskapazitäten für Farbstoff. Sie lagen jedoch noch deutlich unter der Bindungskapazität von reiner DNS, was dafür spricht, daß noch Proteine an der DNS gebunden bleiben. Die Behandlung von fixiertem Chromatin mit einer Pufferlösung

(2xSSC 3 Stund. 60°C) führte dann wieder zu einer Reduzierung der Bindungskapazität, die in der Größenordnung von unfixiertem Chromatin lag. Durch diese Vorbehandlung, wie sie bei Giemsa Bandenmethoden üblich ist, werden nach Meinung von Comings und Avelino 1975 DNS-Protein-Bindungen in bestimmten chromosomalen Bezirken so verstärkt, daß eine Bindung von Farbstoffen an die DNS nicht mehr möglich ist.

2.5. Erklärungsversuche für die Entstehung von G-Banden

Zum Mechanismus der G-Bandenfärbung sind zahlreiche Vorstellungen entwickelt worden, die von den unterschiedlichen methodischen Ansätzen der Untersucher ausgehen und deshalb auch zu unterschiedlichen Ergebnissen führen.

2.5.1. Unterschiedliche Chromatinverteilung

McKay 1973 beobachtete an fixierten Metaphasechromosomen phasenkontrastmikroskopisch G-Bandenstrukturen und schloß daraus, daß den G-Banden eine unterschiedliche, nicht präparativ bedingte Verteilung von Chromatin auf den Chromosomen zugrunde liegt.

Filion 1974, Blakey und Filion 1976 fanden bei rasterelektronenmikroskopischen Untersuchungen quer verlaufende Erhebungen in den mit Giemsa gefärbten Bandenregionen von pflanzlichen Chromosomen. Sie zeigten, daß es sich bei diesen Erhebungen nicht um eine unterschiedliche Verteilung des Chromatins handelt, sondern um eine Akkumulation von Farbstoffmolekülen. Der Chromosomenkollaps während der Vorbehandlung mit SSC und Sörensen-Puffer führte zu keiner erkennbaren Chromatinumlagerung. Eine unterschiedliche Chromatinverteilung ist somit nicht Ursache der G-Bandenentstehung.

2.5.2. Unterschiedliche DNS-Zusammensetzung

Blakey et al. 1976 untersuchten, ob generelle Unterschiede im Guanin Cytosin bzw. Adenin Thymin-Gehalt von Chromosomen die G-Bandenentstehung erklären können. G-Bandenfärbungen von drei verschiedenen Tulpenarten zeigten, daß sich bei den drei Tulpenarten jeweils unterschiedlich große Chromosomenbezirke mit der G-Bandenfärbung anfärben lassen. DNS-Analysen und die Schmelzprofile der DNS der Tulpenarten zeigten, daß der prozentuale Anteil von Adenin Thymin bzw. Guanin Cytosin bei allen Tulpenarten gleich ist. Generelle Unterschiede im AT bzw. GC-Gehalt können somit die unterschiedliche Größe der G-Bandenbezirke der drei Tulpenarten nicht erklären. Die Vermutung, daß

repetitive DNS Sequenzen die unterschiedlich großen G-Bandenbezirke verursachen könnten, konnte nicht bestätigt werden, da in den Heterochromatinfractionen keine SatellitenDNS gefunden werden konnte.

2.5.3. Beteiligung der Histone

Brown et al. 1975 inkubierten fixierte und mit Trypsin behandelte Hamsterchromosomen in Histonlösungen und beobachteten, daß die Histonfraktionen H1, und in geringem Umfang H2a, die anschließende G-Bandenfärbung blockierten, während H2b, H3, H4, Cytochrom C und Albumin keinen Einfluß auf anschließende G-Bandenfärbung hatten. Die Autoren schlossen daraus, daß die Entfernung von H1 und H2a während der Fixierung eine Voraussetzung für anschließende G-Bandenfärbung ist.

Bei ähnlichen Versuchen erzielten Holmquist und Comings 1976 dagegen folgende Resultate: Polyarginin und Polylysin sowie die Histone H1, H2a, H2b und H3 verhinderten in gleichem Umfang die G-Bandenfärbung, da sie als positiv geladene Moleküle an die negativ geladenen Phosphatgruppen der DNS binden.

Um eine selektive Ablösung der Histone als Ursache der G-Bandenentstehung auszuschließen, wurden aufgetropfte Chromosomenpräparate für 4 h in 0,2 n HCl inkubiert, in der Annahme, daß durch diese Behandlung alle Histone von den Chromosomen abgelöst werden. Anschließend konnten die Chromosomen erfolgreich G-Banden gefärbt werden. Die Autoren schlossen aus diesen Befunden, daß Histone nicht am G-Bandenmechanismus beteiligt sind (Comings u. Alvelino 1974).

2.5.4. Bindung spezifischer Farbstoffkomplexe an spezifische Stellen des Chromatinfadens.-

Mögliche Beteiligung von Nicht-Histon-Proteinen

Auch Sumner und Evans 1973 und Sumner 1980 kommen zu dem Schluß, daß Histone nicht am G-Bandenmechanismus beteiligt sind, da aufgrund eigener Untersuchungen alle Histone während der Fixation abgelöst werden. Vielmehr kommt es nach ihrer Vermutung zu einer ionischen Bindung einer spezifischen "Magenta" Farbstanz - die aus einem Molekül Eosin und zwei Molekülen Methylenblau besteht - an die Phosphatgruppen der DNS in den heterochromatischen Bezirken des Chromosoms. Diese Bindung wird zusätzlich durch Wasserstoffbrückenbindungen stabilisiert. Diese Wasserstoffbrückenbindungen werden durch die spezifische stereochemische Struktur des DNS-Fadens ermöglicht. An anderen Stellen des Chromosoms, z.B. in euchromatischen Bezirken, wo die DNS durch Bindung an Nicht-Histon Moleküle in einem weniger kondensierten Zustand vorliegt, kann es zu keiner Farbstoffbindung kommen.

Eine Beteiligung von Eosin an der Banden-Färbung ist auch bei der "Giemsa 11"-Methode von Bobrow et al. 1972 möglich. Bei dieser G-Bandenmethode fällt die rötliche Anfärbung des Heterochromatins auf (Wyant et al. 1976).

Nach Comings 1975 lagern sich Farbstoffpolymere seitlich an die Phosphatgruppen der DNS an (side stacking). In euchromatischen Chromosomenbezirken wird die Farbstoffbindung durch Nicht-Histone verhindert, die durch spezifische Vorbehandlungsschritte fester an das Euchromatin gebunden wurden.

3. Problematik

Die G-Bandenmethode von Walther kommt im Gegensatz zu anderen G-Bandenmethoden ohne Vorbehandlungsschritte aus. Fixierte Metaphasechromosomen werden direkt in einer ionenhaltigen Farbstofflösung gefärbt. Sie bietet sich daher als einfache Färbemethode an, einen Beitrag zur Aufklärung des G-Bandenmechanismus zu leisten.

In der vorliegenden Arbeit versuchte ich, mit Hilfe dieser Methode, folgende Fragen zu beantworten:

- I. In welchem morphologischen Zustand liegen die Chromosomen nach der Fixierung vor, sind phasenkontrastmikroskopisch Bandenstrukturen zu beobachten?
- II. Wie läuft der Färbevorgang unter mikroskopischer Kontrolle ab?
- III. Welche Rolle spielt der Farbstoff in der Färbung?
- IV. Welche Rolle spielt die Ionenlösung bei der G-Bandenentstehung?
- V. Warum färbt die ionenhaltige Farbstofflösung selektiv nur bestimmte Chromosomenbezirke an?

Durch mikroskopische Beobachtung der Chromosomen vor und während des Färbevorganges, sowie durch systematische Variation sämtlicher Variablen dieser G-Bandenmethode versuchte ich, die offenen Fragen zu beantworten.

4. Material und Methode

4.1. Chromosomenpräparation

4.1.1. Kulturansatz

Die Chromosomenpräparation erfolgt nach der Mikromethode von Arakaki und Sparkes (1963).

Sterile, graduierte, spitzkonische Zentrifugenröhrchen werden mit ca. 4-5 ml Nährmedium (Chromosomenmedium 1A von GIBCO) gefüllt. Die Röhrchen werden mit sterilen Silikonstopfen verschlossen und beschriftet. In dem Medium sind Phythämagglutinin (PHA) und Antibiotica schon enthalten.

Aus der mit einer sterilen Lanzette verletzten Fingerbeere werden 0,2 ml Blut in einer heparinisierten Pipette angesaugt und sogleich in das Kulturgläschen gebracht. Bei 37° C werden die Kulturen 65 Std. lang inkubiert, wenn möglich, einige Male vorsichtig aufgewirbelt.

4.1.2. Kulturabbruch

Colcemid-Zugabe:

1 ml (=1 mg) Colcemid (Ciba) werden zu 100 ml Hank-Lösung gegeben, gut gemischt, und davon 0,15 ml (0,0015 mg Colcemid) in jedes Kulturglas gegeben; Endkonzentration 0,03 mg %. Nach dem Mischen werden die Kulturen nochmals 3 Std. lang inkubiert.

Danach wird der Bodensatz in den Röhrchen gut aufgeschüttelt und bei ca. 800-1000 Umdrehungen/min. zentrifugiert. Der Überstand wird abgesaugt (ca. bis 0,5 ml).

4.1.3. Hypotone Behandlung

Zu dem Bodensatz von ca. 0,5 ml gibt man ca. 5 ml 0,075 M KCl-Lösung, die im Brutschrank (37°C) vorher angewärmt wurde. Nach guter Vermischung von Bodensatz und hypotoner Lösung werden die Röhrchen 5 min im Brutschrank (37°C) inkubiert. Dann wird 5 min bei 600 Umdr./min zentrifugiert. Der zellfreie Überstand wird nicht zu knapp abgesaugt.

4.1.4. Fixation

Der Bodensatz wird leicht gemischt und dann 3 ml Fixativ (Methanol/Eisessig 3:1) zugegeben. Nach vorsichtigem Mischen wird 5 min bei 800 Umdr./min zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes werden erneut 3 ml Fixativ zugegeben und die Röhrchen 15 min stehengelassen. Sollte der Überstand noch bräunlich sein (hämolyisierte Erythrozyten), wird das Fixativ erneut gewechselt.

4.1.5. Herstellung der Präparate (Auftropfen)

Nach dem Zentrifugieren und Absaugen wird der Bodensatz (ca. 0,2-0,5 ml) gut gemischt und auf fettfreie Objektträger (mindestens 1 Tag sollten die Objektträger in Äther-Alkohol-Gemisch liegen), die in kaltem Aqua dest. aufbewahrt werden, aufgetropft und an der Luft getrocknet. Nach der Trocknung werden sie sofort gefärbt oder ungefärbt phasenkontrastmikroskopisch untersucht.

4.2. Die Färbung

4.2.1. Giemsa-Bandenfärbung nach Walther (Originalanweisung)

Die frisch aufgetropften Chromosomenpräparate werden 20 min in folgender Farblösung inkubiert:

1 Teil Leishman Eosin-Methylenblau-Lösung aus
Trockensubstanz Merck Art. 1350 0,12g,
gelöst in 100 ml Methanol bei 40°C,

4 Teile Sörensenpuffer pH 6,8 aus
 KH_2PO_4 1/15 M 50,8 ml
 Na_2HPO_4 1/15 M 49,2 ml

Anschließend kurzes Spülen in Leitungswasser oder Aqua dest.

4.2.2. Modifizierte G-Bandenfärbung nach Walther

Die routinemäßige Anwendung dieser Färbemethode führte zu unterschiedlichen Färbungsergebnissen. Je nach Qualität des Farbstoffansatzes war Nachfärben von einigen Minuten Dauer, bzw. Ent- und Neufärben, notwendig.

Um gleichmäßigere Färberesultate zu erzielen, versuchte ich, den Farbansatz wie folgt zu standardisieren:

Herstellung der Farbstammlösung:

100 ml Methanol werden in einem mit Parafilm verschlossenen 100 ml Erlenmeyerkolben im Wasserbad auf 60°C erhitzt. Anschließend werden 0,12 g Leishman Eosin-Methylenblau, Substanz Merck Art.Nr. 1350, 30 min bei 60°C gelöst, wobei das Gefäß 2x/sek geschwenkt wird. Nach 24stündiger Aufbewahrung bei Zimmertemperatur wird die Lösung in ein braunes Vorratsglas umgefüllt.

6 ml der Stammlösung werden mit 60 ml 0,066 molarem Sörensenpuffer ($\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$ 1:1) verdünnt. Die Färbezeit beträgt ca. 20 min.

Gegenüber der Originalvorschrift änderte sich, da ich eine höhere Farbstoffkonzentration in der Stammlösung erzielte, die Farbstoffpuffer-Relation von 1:4 auf 1:10, Pufferkonzentration und Färbezeit blieben unverändert.

In der Regel erzielte ich mit dieser Vorschrift gute Resultate, wenngleich ich eine vollständige Standardisierung der Färbung nicht erzielen konnte.

4.2.3. Photometrische Analyse des Farbstoffes

Zur Analyse des Farbstoffes benutzte ich das Photospektrometer Typ Cary 118 c. Um Veränderungen der Farbstofflösung durch Verdünnung zu vermeiden, analysierte ich die gebrauchsfertige Farblösung in einer 2 mm Küvette. Die Extinktion wurde in einem Wellenlängenbereich zwischen 450 und 800 nm aufgezeichnet.

4.2.4. Variationen von Farbstoff- bzw. Pufferanteil der Färbelösung

Bei sämtlichen Experimenten, in welchen ich den Ionengehalt der Färbelösung veränderte, verwendete ich Ionenlösungen, die von der Apotheke der Poliklinik angesetzt wurden oder Originallösungen der Firma Merck.

Alle Experimente, in denen ich eine oder mehrere Komponenten der Färbelösung veränderte, führte ich mindestens dreimal durch.

4.3. Einbettung

Die Einbettung der Präparate erfolgte mit EUKITT (Firma O.Kindler, Freiburg, Silberbachstr. 25).

4.4. Mikroskopie

Zur phasenkontrastmikroskopischen Untersuchung legte ich auf frisch aufgetropfte Chromosomenpräparate ein Deckglas und untersuchte sie mit einem Leitz-Orthoplan-Mikroskop. Ich benutzte ein 100 Øl Phako-Objektiv.

Den Färbvorgang und die gefärbten, eingebetteten Chromosomenpräparate untersuchte ich ebenfalls mit dem Leitz-Orthoplan-Mikroskop und einem 100 Øl Apolan-Objektiv.

Zur Beobachtung des Färbvorgangs tropfte ich auf frische Chromosomenpräparate Farblösung und legte ein Deckglas darauf und mikroskopierte sofort.

4.5. Mikrophotographie

Zur photographischen Aufzeichnung verwendete ich einen Agfa-Ortho 25 Kleinbild-Film.

Die Endvergrößerung auf den Abbildungen ist ca. 1000- bis 2000-fach.

5. Ergebnisse

5.1. Morphologie der Chromosomen vor der Färbung

Bei der Betrachtung von ungefärbten Chromosomen unter dem Phasenkontrastmikroskop konnte ich auf den schlanken Chromosomen helle und dunkle Bezirke unterscheiden, die aufgrund des Phasenkontrastprinzips als Regionen unterschiedlicher Dichte aufzufassen sind. Das Muster dieser Dichteunterschiede konnte ich keinem bekannten Bandenmuster zuordnen. Die Enden der Chromosomen erscheinen deutlich dunkler und gleichen daher T-Banden. Die mittleren Abschnitte der Chromosomenarme weisen Bezirke erhöhter Dichte auf, die mit dem G-Bandenmuster übereinstimmen. Einige zentromernahe Regionen bilden sich ebenfalls als Zonen erhöhter Dichte ab und erinnern an C-Banden (Abb.18a, 19).

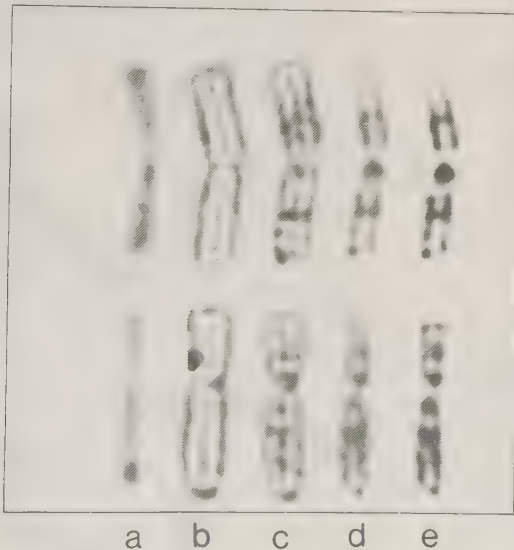


Abb. 18 Darstellung des Färbeproganges der Chromosomen 1 und 2

a	ungefärbt (Phasenkontrast)	d	nach 8 min
b	nach 1 min	e	nach 16 min
c	nach 3 min		



Abb. 19 Darstellung des Färbevorganges eines Ausschnittes aus der gleichen Metaphase

a ungefärbt (Phasenkontrast)
b nach 1 min

c nach 3 min
d nach 16 min

5.2. Dynamik des Färbevorganges (Abb. 18, 19b)

Circa 2 Minuten nach Eintauchen der Präparate in die Farblösung beobachtete ich unter dem Hellfeldmikroskop geschwollene Chromosomen, auf deren Armen keine Strukturen zu erkennen waren. Es waren lediglich die Konturen der Chromosomenarme sichtbar. Die Chromosomenarme selbst erschienen glasig durchsichtig (Abb. 18 b).

Im Laufe der nächsten 10 Minuten werden bestimmte Chromosomenabschnitte zunehmend angefärbt (Abb. 18 c), während andere Chromosomenabschnitte keine Farbe annehmen. Nach ca. 20 Minuten Färbezeit war dann ein scharfes, klares Bandenmuster entstanden (Abb. 18 d). Die Chromosomen sind während des Färbevorganges zunehmend schlanker geworden. Weiteres Färben führt zu Chromosomen, die zum Teil ihr Bandenmuster beibehalten, zum anderen Teil homogen angefärbt werden. Mit langen, schlanken Chromosomen der frühen Metaphase konnte ich wesentlich bessere Färbeergebnisse erzielen, als mit kurzen, dicken Chromosomen der späten Metaphase.

Als ich gefärbte Chromosomen anschließend in Sörensenpuffer 30 Minuten inkubierte, verschwand die Färbung. Zurück blieben geschwollene Chromosomen; eine Wiederholung des Färbevorganges war möglich.

Die Schwellung der Chromosomen beobachtete ich auch bei Inkubation der Chromosomen in destilliertem Wasser. Zugabe von Trypsin (0,25 % 1:500 verdünnt) beeinflusste in keiner Weise den Schwellungs- oder Färbevorgang der Chromosomen. Einen evtl. Einfluß von cytoplasmatischen Enzymen auf die G-Bandenentstehung schloß ich durch Zugabe eines Enzyminhibitors (Phenylmethansulfonylfluorid PMSF) zur Färbelösung aus. Ich stellte keine Veränderung des Färbe- bzw. Schwellungsvorganges fest.

5.3. Einfluß des Farbstoffes auf die G-Bandenentstehung

5.3.1. Spektrophotometrische Analyse des Farbstoffes (Abb.20)

Die spektrophotometrische Analyse der Standard-Färbelösung ergab zwei Absorptionsmaxima: Einen hohen, schmalen Gipfel bei 512 nm (rote Komponente) und einen niedrigen breiten Gipfel zwischen 600 und 650 nm (blaue Komponenten). Die Absorptionsspektren der verschiedenen Farblösungsansätze zeigten nur geringe Unterschiede, die sich im Wesentlichen in der Höhe der Extinktionen äußerten. Unbefriedigende Färbeergebnisse trotz unveränderter Stammlösungsansätze konnte ich nicht mit spezifischen Veränderungen im Absorptionsspektrum der Farblösung in Zusammenhang bringen.

5.3.2. Variation der Farbstoffquantität im Farbansatz

Die Färbelösung stellte ich durch Verdünnung der modifizierten Farbstammlösung im Verhältnis 1:10 mit Sörensenpuffer her. Eine quantitative Veränderung des Farbstoffgehaltes der Färbelösung erreichte ich durch Änderung der Farbstammlösungs: Puffer Relation auf 1:7 und 1:15. In diesen so hergestellten Farbstofflösungen färbte ich die Chromosomenpräparate 20 Minuten. Vor jeder Färbung analysierte ich die Farbstofflösung spektrophotometrisch. Ich fand eine Erhöhung, bzw. eine Erniedrigung beider Absorptionsmaxima (Abb.20 a-c), die Form der Gipfel änderte sich nicht. Die Färbungsergebnisse zeigt die Abb.21 a-c). Nach 20 Minuten Färbung waren die Chromosomen bei einem Farbstammlösungs:Puffer Verhältnis von 1:7 überfärbt. Die Chromosomen zeigten eine homogene Anfärbung ohne erkennbare Bandenstrukturen. Die Analyse des Färbevorganges zeigte, daß bereits nach 5 Minuten Färbezeit eine homogene Anfärbung der Chromosomen eingetreten ist, die im Verlauf der weiteren Färbung an Intensität zunahm. Ich beobachtete kein Stadium, in welchem eindeutig Bandenstrukturen sichtbar waren (Abb.21 a).

Bei einem Farbstammlösungs:Puffer Verhältnis von 1:15 waren die Chromosomen nach 20 Minuten Färbezeit geschwollen und hatten keinen Farbstoff angenommen. Der kurz nach dem Einbringen in die Farblösung entstandene Schwellungszustand blieb bis zum Ende der Färbezeit bestehen (Abb.21 c).

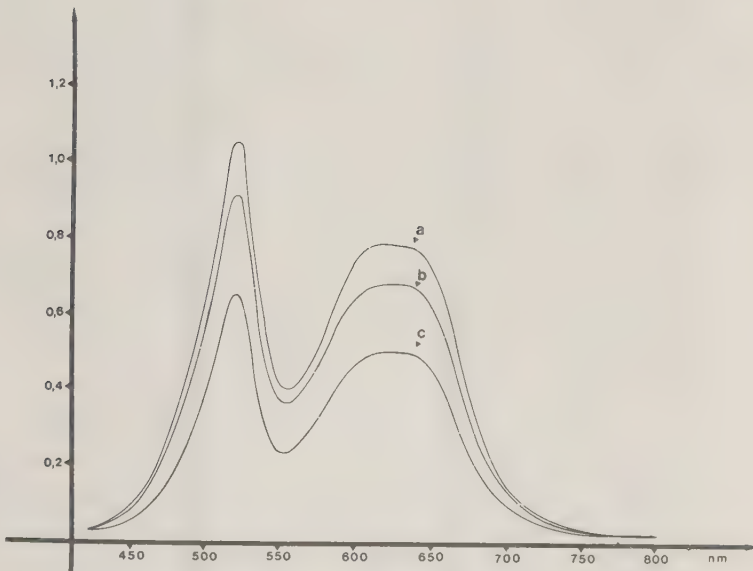


Abb. 20 Spektrophotometrische Analyse der Färbelösung

- a Farbstoffpuffer-Relation 1/7
- b Farbstoffpuffer-Relation 1/10
- c Farbstoffpuffer-Relation 1/15

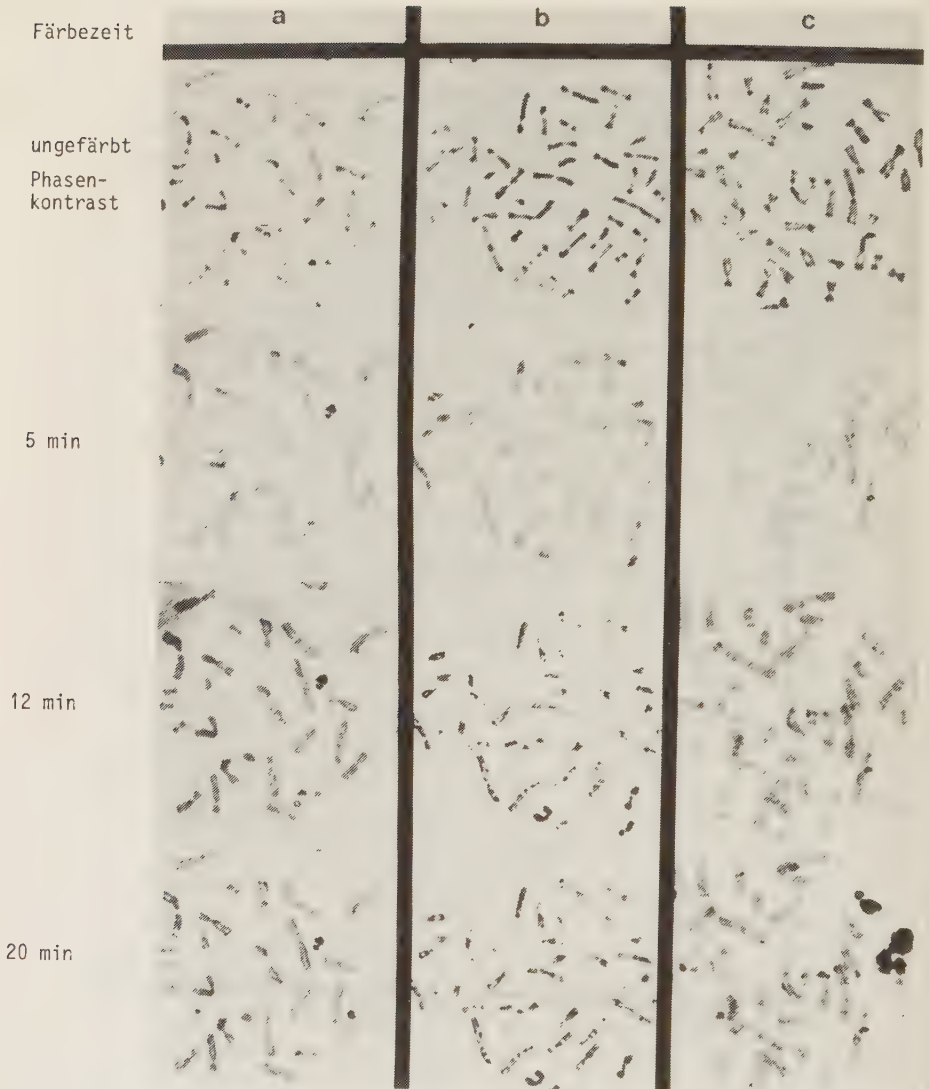


Abb. 21 Einfluß der Farbstoffkonzentration auf die G-Bandenentstehung

	Farbstoff/Puffer Verhältnis	Pufferkonz.	Färbeergebnis
a	1/7	0,06 M	homogen überfärbt
b	1/10	0,06 M	Giemsa Banden
c	1/15	0,06 M	unterfärbt geschwollen

5.3.3. Veränderung der Farbstoffqualität im Farbanatz

Die Möglichkeit der Veränderung der Farbstoffqualität der Farbstofflösung entdeckte ich durch eine Zufallsbeobachtung. Ich unternahm eine Reihe von Versuchen, um die Haltbarkeit der Farbstammlösungen zu verbessern, da der Farbstoff nach einiger Zeit aus der Farbstammlösung ausfällt. Unter anderem setzte ich der Farbstammlösung geringe Mengen Methanol zu. Zu meinem Erstaunen führte der Zusatz von Methanol trotz gleichbleibender Farbstoffkonzentration zu dem Verlust der Färbefähigkeit der Farblösung. Ich ersetzte daraufhin in einem Experiment unterschiedliche Mengen der Pufferlösung der üblichen Färbelösung durch Methanol. Die Ionenkonzentration paßte ich der Standard-Färbelösung an, die Farbstoffkonzentration blieb ebenfalls unverändert. Vor der Färbung untersuchte ich die Färbelösungen spektrophotometrisch. Methanol enthaltende Färbelösungen zeigten trotz unverändertem Farbstoffanteil, in Abhängigkeit von der Methanol-Konzentration, eine stark erhöhte Extinktion bei 650 nm (Abb.22). Gleichzeitig verlor die Farblösung ihre Färbefähigkeit. Die Chromosomen waren geschwollen und zeigten geringe, bzw. keine Anfärbung.

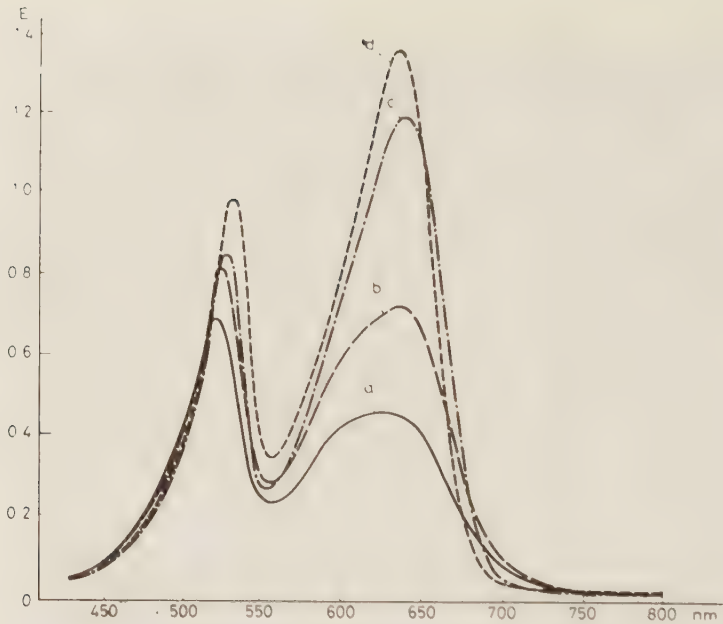


Abb. 22 Einfluß von Methanol auf die Absorptionskurven und das Färbeergebnis

- | | | |
|---|---|---|
| a | 6 ml Farbstammlösung
60 ml Sörensenpuffer (0,066 M) | G-Banden |
| b | 6 ml Farbstammlösung
30 ml Sörensenpuffer (0,132 M)
24 ml H ₂ O
6 ml Methanol | unterfärbte ge-
schwollene Chromosomen |
| c | 6 ml Farbstammlösung
30 ml Sörensenpuffer (0,132 M)
30 ml Methanol | ungefärbte Chromosomen |
| d | 6 ml Farbstammlösung
30 ml Methanol | ungefärbte Chromosomen |

5.4. Analyse des Einflusses der Pufferlösung auf die Bandenentstehung

In der Standard-Färbevorschrift ist ein Sörensenpuffer (0,066 M) vorgeschrieben, der nahezu gleiche Teile Na_2HPO_4 und KH_2PO_4 enthält. Die Färbelösung besitzt dann einen pH von 6,8.

5.4.1. Änderung der Osmolarität der Färbelösung

Um zu ermitteln, ob osmolare oder ionale Eigenschaften der Färbelösung einen Einfluß auf die G-Bandenentstehung haben, verdünnte ich die Farbstammlösung anstelle von Sörensenpuffer mit Harnstofflösungen in einem Konzentrationsbereich von 0,01-0,3 M. Die Farbstoffkonzentration blieb konstant. Nach anfänglichen Stadien der chromosomalen Schwellung entstanden keine G-Banden, sondern homogen gefärbte Chromosomen.

Im nächsten Versuchsansatz änderte ich die Osmolarität der Färbelösung unter Beibehaltung der Ionenkonzentration in der Färbelösung. Ich setzte der Standard-Färbelösung unterschiedliche Mengen an Harnstoff zu, so daß es zu Harnstoffkonzentrationen von 0,01-0,2 M in der Färbelösung kam. Als Färbeergebnisse erhielt ich bei allen Harnstoffkonzentrationen G-Banden.

Harnstoffkonzentration	Ionenkonzentration (Sörensenpuffer)	Färbeergebnis
0,01 M		homogene Anfärbung
0,05 M		homogene Anfärbung
0,1 M		homogene Anfärbung
0,3 M		homogene Anfärbung
0,01 M	0,066	Giemsa-Banden
0,05 M	0,066	Giemsa-Banden
0,1 M	0,066	Giemsa-Banden
0,2 M	0,066	Giemsa-Banden

Tab. 6 Änderung der Osmolarität in der Färbelösung

5.4.2. Änderung der Pufferkonzentration der Färbelösung

In den Farbansätzen änderte ich die Pufferkonzentration, indem ich die üblichen 6 ml Farbstammlösung mit 60 ml Sörensen-Puffer in einem Konzentrationsbereich von 0,025 M bis 0,1 M verdünnte. Die Resultate zeigt Abb. 23.

Bei einer Ionenkonzentration von 0,025 M waren die Chromosomen bereits nach 5 min schlank und homogen gefärbt. Bei der Beobachtung des Färbevorgangs sieht man, daß der Farbstoff gleichmäßig die Chromosomenarme anfärbt. Zu keinem Zeitpunkt des Färbevorgangs ist eine selektive Anfärbung bestimmter Chromosomenabschnitte zu beobachten. Bei einer höheren Pufferkonzentration (0,1 M) waren die Chromosomen nach 20 min ungefärbt und geschwollen und zeigten keinerlei G-Bandenfärbung. Zu keinem Zeitpunkt der Färbung konnte ich eine Farbstoffanlagerung an bestimmte Chromosomenabschnitte beobachten.



Abb. 23 Einfluß unterschiedlicher Ionenkonzentrationen auf die G-Bandenentstehung

Molarität

Färbeergebnis

a 0,025

homogen überfärbt

b 0,066

G-Banden

c 0,1

geschwollen unterfärbt

5.4.3. Variation der Pufferionen in der Färbelösung (Abb. 24)

Durch Änderung der ionalen Zusammensetzung der Pufferlösung versuchte ich zu ergründen, welche Ionen ursächlich an der Bandenentstehung beteiligt sind. Ich ersetzte die Pufferlösung durch verschiedene Salzlösungen gleicher Molarität und verdünnte 6 ml Farbstammlösung wie üblich mit 60 ml Salzlösung. Die Entstehung der G-Banden wurde nicht beeinflusst, als ich im Sörensenpuffer $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$) Kalium durch Natrium ($\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$) oder Natrium durch Kalium ($\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$) ersetzte. Als ich eine 0,066 M Na_2SO_4 Lösung verwendete, waren die Chromosomen nach 20 min noch geschwollen und ungefärbt. Nach Reduktion der Molarität auf 0,05 M erzielte ich G-Banden in der gewohnten Qualität.

Um zu prüfen, ob Kalium-oder Natriumionen für die G-Bandenentstehung erforderlich sind, ersetzte ich sie durch andere Kationen. Bei allen bisherigen Variationen war bei gleichbleibender Farbstoffkonzentration eine Kationenkonzentration von 0,1 M erforderlich, um G-Banden zu färben.

G-Banden erhielt ich auch mit einer 0,05 M Li_2SO_4 -Lösung. Als ich einwertige Kationen durch zweiwertige ersetzte (MgSO_4 0,066 M), blieben die Chromosomen nach 20 min Färbung geschwollen und banden keinerlei Farbstoff. Erst die Reduktion der Magnesiumionenkonzentration um den Faktor 10 auf 0,007 M ergab wieder G-Banden. Weitere Reduktion der Konzentration auf 0,0035 M ergab gleichförmig gefärbte Chromosomen. Bei der Verwendung von CaCl_2 erhielt ich G-Banden mit einer 0,0021 M Lösung.

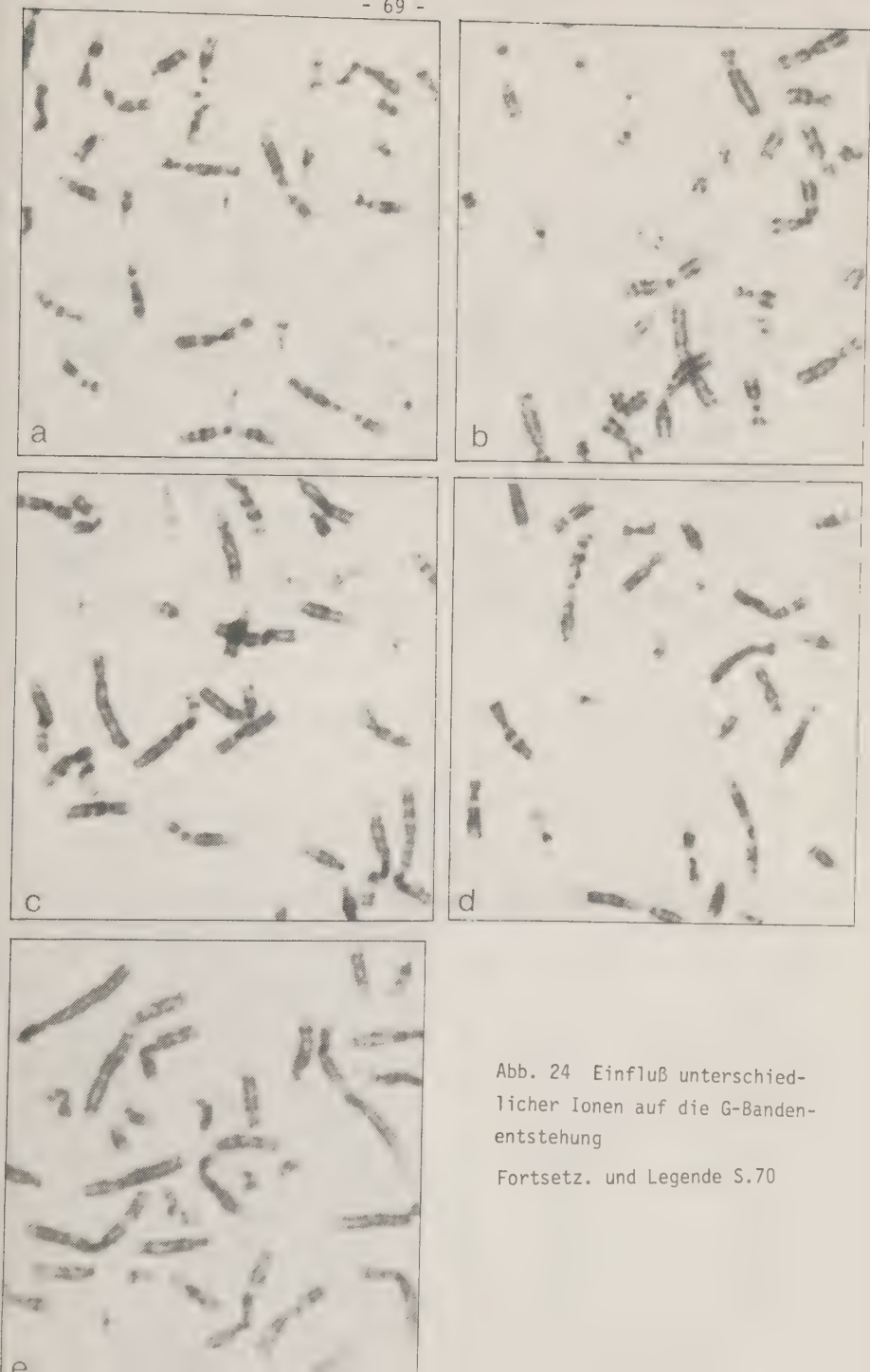


Abb. 24 Einfluß unterschiedlicher Ionen auf die G-Bandenentstehung

Fortsetz. und Legende S.70

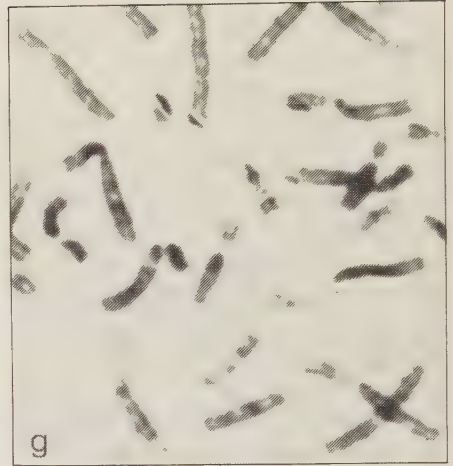
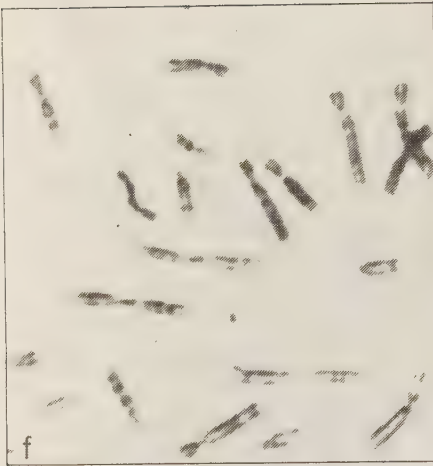


Abb. 24 Einfluß unterschiedlicher Ionen auf die G-Bandenentstehung (Forts.)

Ionen		M	Kationen		M	Anionen		M
a	$\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$	0,066	Na^+		0,1	$\text{HPO}_4^{--}/\text{H}_2\text{PO}_4^-$		0,066
b	$\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$	0,066	Na^+		0,1	$\text{HPO}_4^{--}/\text{H}_2\text{PO}_4^-$		0,066
c	$\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$	0,066	K^+		0,1	$\text{HPO}_4^{--}/\text{H}_2\text{PO}_4^-$		0,066
d	Na_2SO_4	0,05	Na^+		0,1	SO_4^{--}		0,05
e	Li_2SO_4	0,05	Li^+		0,1	SO_4^{--}		0,05
f	MgSO_4	0,007	Mg^{++}		0,007	SO_4^{--}		0,007
g	CaCl_2	0,0021	Ca^{++}		0,0021	Cl^-		0,0042

5.5. Parallele Veränderung von Puffer und Farbstoffkonzentration (Tab.7)

Änderung der Ionenkonzentration und Änderung der Farbstoffkonzentration können zu ähnlichen Veränderungen der Färbeergebnisse führen.

Zur Untersuchung des Zusammenwirkens von Farbstoffkonzentration und Ionenkonzentration variierte ich gleichzeitig die Farbstoffkonzentrationen in einem Bereich von 1:23 bis 1:3 und die Pufferkonzentrationen in einem Bereich von 0,03 bis 0,2 M.

Reduzierung der Pufferkonzentration und Erhöhung der Farbstoffkonzentration wirken gleichartig auf das Färbeergebnis und führen zu homogen überfärbten Chromosomen.

Erhöhung der Pufferkonzentration und Reduzierung der Farbstoffkonzentration wirken ebenfalls gleichartig und führen zu unterfärbten, geschwollenen Chromosomen.

Erhöhung der Pufferkonzentration und Erhöhung der Farbstoffkonzentration heben sich ebenso wie Reduzierung der Pufferkonzentration und Reduzierung der Farbstoffkonzentration in ihrer Wirkung auf die Chromosomen auf und führen in einem bestimmten Bereich zu G-Banden gefärbten Chromosomen.

Puffer Molarität Na_2HPO_4 / KH_2PO_4

	0,03 M	0,05 M	0,066 M	0,12 M	0,2 M
1/23	kaum G-Banden homogene An- färbung	kaum G-Banden unterfärbt geschwollen	geschwollene unterfärbte Chromosomen	geschwollene unterfärbte Chromosomen	geschwollene unterfärbte Chromosomen
1/16	kaum G-Banden homogen über- färbt	gute G-Banden	kaum G-Banden geschwollene Chromosomen	geschwollene unterfärbte Chromosomen	geschwollene unterfärbte Chromosomen
1/10	keine G-Banden homogen über- färbt	kaum G-Banden überfärbte Chromosomen	gute G-Banden	kaum G-Banden geschwollene Chromosomen	geschwollene unterfärbte Chromosomen
1/8	homogen überfärbte Chromosomen	keine G-Banden homogen überfärbt	kaum G-Banden überfärbt	gute G-Banden	kaum G-Banden unterfärbte Chromosomen
1/5	homogen überfärbte Chromosomen	homogen überfärbte Chromosomen	keine G-Banden homogen über- färbt	kaum G-Banden unterfärbte Chromosomen	kaum G-Banden unterfärbte Chromosomen

Farbstoff-Puffer-Verhältnis

Tab. 7 Wirkung paralleler Veränderung von Farbstoffkonzentration und Pufferkonzentration auf die G-Bandenentstehung

6. Diskussion

6.1. Morphologischer Zustand der Chromosomen nach der Fixierung

Während der Fixierung werden unter dem Einfluß von Methanol/Eisessig wenn nicht alle, so doch ein großer Teil der Histone von der DNS abgelöst (Tab. 4). Gleichzeitig wird die "höhere" Chromatinstruktur aufgelöst (siehe 2.3.3.). Aufgrund der hohen Wasserstoffionenkonzentration des Fixativs kommt es zu einem Ausfällen der DNS; sie ist im Fixativ unlöslich, da die Wasserstoffionen an die negativen Phosphatgruppen der DNS binden und so die Polarität der DNS aufheben. Die kritische Wasserstoffionenkonzentration dürfte bei pH 2,6 liegen. Bei einem pH unter 2,6 ist die DNS unlöslich (Gormley u. Ross 1976).

Im Gegensatz zu McKay 1973, der phasenkontrastmikroskopisch bei den Giemsa-Banden ähnliche Dichteunterschiede fand, beobachtete ich wie bereits Sumner et al. 1973, Blakey u. Filion 1976 und Ross u. Gormley 1973 phasenkontrastmikroskopisch keine G-Bandenstrukturen. Ich halte die phasenkontrastmikroskopisch beobachteten Dichteunterschiede vielmehr für präparativ bedingte Chromatinaggregationen. Durch die fixativbedingte Histonablösung wird die DNS ihrer höheren Struktur beraubt und aggregiert bevorzugt in den zentromernahen Chromosomenbezirken, an den Enden der Chromosomen und zum Teil an anderen Stellen auf den Chromosomenarmen.

Die phasenkontrastmikroskopisch beobachtbaren Dichteunterschiede können daher nicht als Vorläufer der bei anschließender G-Bandenfärbung anfärbbaren Chromosomenabschnitte aufgefaßt werden, sondern stellen vielmehr artefiziell aggregierte Chromatinanhäufungen dar.

6.2. Die Bedeutung der chromosomalen Schwellung für die G-Bandenentstehung

Beim Einbringen der Chromosomenpräparate in eine wässrige Lösung deren pH um den Neutralpunkt liegt, kommt es zu einer Schwellung der Chromosomen. Diese chromosomale Schwellung wurde bereits von mehreren Autoren beschrieben und als Kollaps der Chromosomenstruktur interpretiert (Gormley u. Ross 1972, Ross u. Gormley 1973, McKay 1973) oder als Folge der Trypsinwirkung im Rahmen der Vorbehandlungen angesehen (Schuh et al. 1975).

Ich halte dagegen die chromosomale Schwellung für eine limitierte Lösung der DNS in einer wässrigen Lösung. Nach Ablösung der Histone besitzt die DNS bei neutralem pH hydrophile Eigenschaften; sie kann sich in Wasser lösen. Bei der mikroskopischen Beobachtung des Färbeprogangs stellte sich diese Lösung der DNS als chromosomale Schwellung, oder anders ausgedrückt, als chromosomale Wasseraufnahme dar. Vorangehende Behandlung der Chromosomen mit Trypsin führt zu einer weiteren Entfernung von Proteinen und könnte dadurch die Löslichkeit der DNS und somit die chromosomale Schwellung verstärken.

Die Lösung der DNS ist jedoch begrenzt, es kommt zu keiner Auflösung der Chromosomenstruktur. Diese limitierte Löslichkeit der chromosomalen DNS kann dadurch erklärt werden, daß die DNS-Fäden in bestimmten Abständen an einem zentralen Chromosomenskelett befestigt sind (Laemmli et al. 1978), was eine vollständige Lösung der DNS verhindert. Bei diesem Chromosomenskelett könnte es sich jedoch auch um artefiziell aggregierte Nicht-Histon-Proteine oder um Reste nicht abgelöster Histone handeln (Okada u. Comings 1980). Ob dieses Chromosomenskelett artefiziell bei der Behandlung von Metaphasechromosomen mit Methanol-Eisessig entsteht, oder ob es sich auch in unbehandelten Chromosomen nachweisen läßt, müssen zukünftige Untersuchungen zeigen.

Essigsäurehaltige Fixative sind für die Chromosomenpräparation besonders geeignet, da die für die nachfolgende Färbung notwendige Histonablösung erfolgt, und gleichzeitig eine Auflösung der chromosomalen Struktur vermieden wird. Weitere Untersuchungen über die Wirkung von verschiedenen Fixativen oder Säuren auf die Chromosomenstruktur könnten wesentlich zum Verständnis der chromosomalen Struktur beitragen.

6.3. G-Bandenentstehung durch Bindung von Farbstoffpolymeren an bestimmte Chromosomenbezirke

Die spektrophotometrische Analyse des Leishman-Farbstoffes bestätigte im wesentlichen die Befunde von Comings 1975 an Giemsa-Farbstoffen, der den breiten asymmetrischen Gipfel der Extinktionskurve als Überlagerung der Extinktion von Farbstoffmonomeren und Farbstoffdimeren, bzw. Polymeren auffaßte. Meine Befunde erhärten die Hypothese von Comings, daß nur Farbstoffpolymere an die DNS binden können. Beim Ansatz der Farbstammlösung löst sich nur ein Teil der Farbstanz in Methanol. Durch den langen Lösungsvorgang bei erhöhter Temperatur entsteht eine übersättigte Farblösung, in der sich ein Teil der Farbstoffmonomere zu Dimeren und Polymeren zusammenlagert. Unter dem Einfluß von Methanol in der Färbelösung kommt es zu einer spektrophotometrisch nachweisbaren Dissoziation der Farbstoffpolymere in Monomere, was zu einem Verlust der Färbefähigkeit der Farblösung führt.

Den zur Giemsa-Bandenfärbung erforderlichen spezifischen Farbstoffkomplex konnte ich spektrophotometrisch nicht quantitativ erfassen; eine photometrische Überprüfung der Färbqualität der Farbstofflösung war daher nicht möglich.

Hinweise, die für eine Beteiligung von Eosin sprechen, wie von Sumner u. Evans 1973 und von Sumner 1980 postuliert wurde, konnte ich nicht finden.

Für ein genaueres Verständnis der Bindung des Farbstoffes an die DNS sind weitere Untersuchungen, insbesondere über die Struktur der Farbstoffpolymere erforderlich.

1. 2. 3. 4. 5. 6. 7. 8. 9. 10. 11. 12. 13. 14. 15. 16. 17. 18. 19. 20. 21. 22. 23. 24. 25. 26. 27. 28. 29. 30. 31. 32. 33. 34. 35. 36. 37. 38. 39. 40. 41. 42. 43. 44. 45. 46. 47. 48. 49. 50. 51. 52. 53. 54. 55. 56. 57. 58. 59. 60. 61. 62. 63. 64. 65. 66. 67. 68. 69. 70. 71. 72. 73. 74. 75. 76. 77. 78. 79. 80. 81. 82. 83. 84. 85. 86. 87. 88. 89. 90. 91. 92. 93. 94. 95. 96. 97. 98. 99. 100.

1. 2. 3. 4. 5. 6. 7. 8. 9. 10. 11. 12. 13. 14. 15. 16. 17. 18. 19. 20. 21. 22. 23. 24. 25. 26. 27. 28. 29. 30. 31. 32. 33. 34. 35. 36. 37. 38. 39. 40. 41. 42. 43. 44. 45. 46. 47. 48. 49. 50. 51. 52. 53. 54. 55. 56. 57. 58. 59. 60. 61. 62. 63. 64. 65. 66. 67. 68. 69. 70. 71. 72. 73. 74. 75. 76. 77. 78. 79. 80. 81. 82. 83. 84. 85. 86. 87. 88. 89. 90. 91. 92. 93. 94. 95. 96. 97. 98. 99. 100.

1. 2. 3. 4. 5. 6. 7. 8. 9. 10. 11. 12. 13. 14. 15. 16. 17. 18. 19. 20. 21. 22. 23. 24. 25. 26. 27. 28. 29. 30. 31. 32. 33. 34. 35. 36. 37. 38. 39. 40. 41. 42. 43. 44. 45. 46. 47. 48. 49. 50. 51. 52. 53. 54. 55. 56. 57. 58. 59. 60. 61. 62. 63. 64. 65. 66. 67. 68. 69. 70. 71. 72. 73. 74. 75. 76. 77. 78. 79. 80. 81. 82. 83. 84. 85. 86. 87. 88. 89. 90. 91. 92. 93. 94. 95. 96. 97. 98. 99. 100.

1. 2. 3. 4. 5. 6. 7. 8. 9. 10. 11. 12. 13. 14. 15. 16. 17. 18. 19. 20. 21. 22. 23. 24. 25. 26. 27. 28. 29. 30. 31. 32. 33. 34. 35. 36. 37. 38. 39. 40. 41. 42. 43. 44. 45. 46. 47. 48. 49. 50. 51. 52. 53. 54. 55. 56. 57. 58. 59. 60. 61. 62. 63. 64. 65. 66. 67. 68. 69. 70. 71. 72. 73. 74. 75. 76. 77. 78. 79. 80. 81. 82. 83. 84. 85. 86. 87. 88. 89. 90. 91. 92. 93. 94. 95. 96. 97. 98. 99. 100.

6.5. Kationen konkurrieren mit Farbstoffpolymeren um die Bindung an bestimmte Chromosomenbezirke

Kombinierte Veränderung von Farbstoffkonzentration und Kationenkonzentration in der Färbelösung ergab, daß Erhöhung der Farbstoffkonzentration durch Erhöhung der Kationenkonzentration und Erniedrigung der Farbstoffkonzentration durch Erniedrigung der Kationenkonzentration in einem bestimmten Rahmen ausgeglichen werden kann (siehe Tab.7).

Diese Befunde lassen sich dadurch erklären, daß spezifische Farbstoffmoleküle (Dimere oder Polymere) mit Kationen um die Bindung an die Phosphatgruppen der DNS konkurrieren (Abb.25). Diese Ergebnisse stimmen auch mit den Befunden von Comings und Avelino 1975 überein, die eine Verhinderung der Farbstoffbindung an die DNS durch kationenhaltige Lösungen fanden; erst eine Erhöhung der Farbstoffkonzentration führte wieder zu einer Bindung von Farbstoffmolekülen an alle Phosphatgruppen der DNS.

Je nach Bindungsstärke der Kationen an die DNS (K, Na, Li gleiche Bindungsstärke, Mg, Ca wesentlich höhere Bindungsstärke an die DNS) (Abb.25) ist bei gegebener Farbstoffkonzentration eine spezifische Kationenkonzentration erforderlich, die es den Farbstoffmolekülen ermöglicht, selektiv Kationen von der DNS zu verdrängen. Es kommt zu einer Anlagerung von Farbstoffpolymeren an die Phosphatgruppen der DNS. Aufgrund einer bisher nicht bekannten unterschiedlichen Kationenaffinität von Eu- und Heterochromatin kommt es zu einer stärkeren Bindung von Kationen an das Euchromatin. Eine Bindung von Farbstoffmolekülen an euchromatische Chromosomenbezirke wird dadurch verhindert.

Neben dieser Gleichgewichtsreaktion zwischen Farbstoffmolekülen und Kationen um ionische Bindung an die Phosphatgruppen der DNS dürfte es zwischen Farbstoffmolekülen und DNS auch zu nicht-ionischen Bindungen in Form von Wasserstoffbrückenbindungen kommen (Horobin u. Bennion 1973).

Für die Beteiligung von nicht-ionischen Bindungen am Färbevorgang spricht auch die weitere Zunahme der Färbeintensität nach 15 min Färbezeit und das Unvermögen von Farbstoffmonomeren an die DNS zu binden. Die langsame Entfärbung von behandelten Chromosomen in Sörensen-Puffer kann durch das langsame Lösen von nicht-ionalen Bindungen zwischen Farbstoffpolymeren und DNS erklärt werden. Nach Lösung dieser Bindung wird das Farbstoffmolekül sofort durch Kationen von der DNS verdrängt. Die rasche Entfärbung von Chromosomenpräparaten durch Methanol beruht auf der Aufspaltung der Farbstoffpolymere in Monomere, die keine Färbefähigkeit besitzen.

Die G-Bandenfärbung läuft demnach in zwei Schritten ab. Im ersten Schritt kommt es zu einer selektiven Anlagerung der Farbstoffmoleküle an das Heterochromatin in Form einer ionalen Bindung. Im weiteren Verlauf der Färbung (zweiter Schritt) bilden sich nicht-ionale Bindungen zwischen Farbstoffpolymeren und DNS aus. Eine Anfärbung des Euchromatins ist nicht möglich, da hier die für die Ausbildung von nicht-ionalen Bindungen notwendige Anlagerung von Farbstoffmolekülen an die DNS durch Kationen verhindert wird.

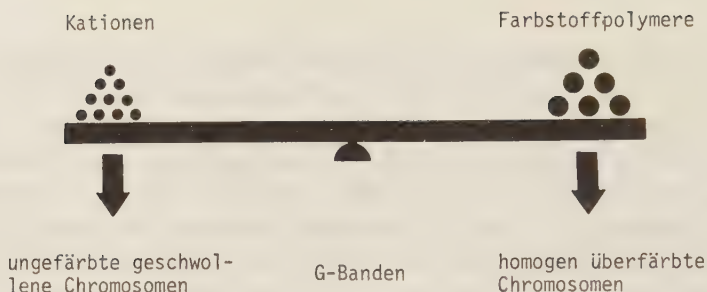


Abb. 25 Schematische Darstellung der Konkurrenzreaktion von Farbstoffmolekülen und Kationen

Das Schema (Abb.25) zeigt die Gleichgewichtsreaktion zwischen Farbstoffmolekülen und Kationen. Erhöhung der Kationenkonzentration, bzw. Erniedrigung der Farbstoffkonzentration führt zu geschwollenen, ungefärbten Chromosomen, Erniedrigung der Kationenkonzentration, bzw. Erhöhung der Farbstoffkonzentration führt zu gleichmäßig überfärbten Chromosomen.

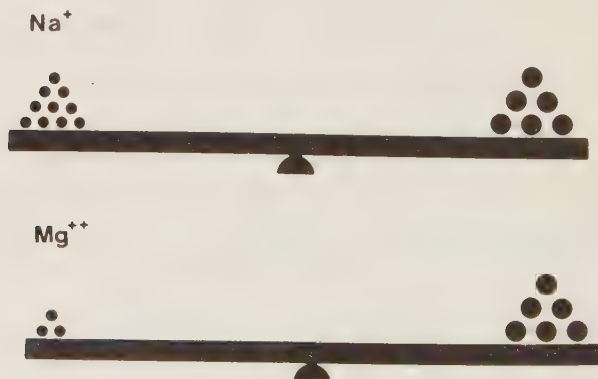


Abb. 26 Schematische Darstellung der höheren Bindungsstärke von Mg an die DNS im Vergleich zu Na

Das Schema (Abb.26) zeigt, daß bei gleicher Farbstoffkonzentration, aufgrund der unterschiedlichen Bindungsstärke der Kationen an die DNS, eine wesentlich geringere Magnesiumionenkonzentration verwendet werden muß, um G-Banden zu färben.

6.6. Bandenmechanismus

Giemsa-Bandenfärbungen sind Ausdruck unterschiedlicher Anfärbbarkeit bestimmter Chromosomenregionen. Die Ursachen dieser unterschiedlichen Anfärbbarkeit sind im wesentlichen unbekannt. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, daß die unterschiedliche Kationenaffinität bestimmter Bezirke fixierter Metaphasechromosomen ohne weitere Vorbehandlungen für die G-Bandenfärbung ausgenutzt werden kann. In der Literatur sind wenig Hinweise zu finden, wie die unterschiedliche Kationenaffinität bestimmter Chromosomenabschnitte erklärt werden könnte. Es ist jedoch mehrfach die Hypothese geäußert worden, daß eine Interaktion von Nicht-Histonen und DNS in den euchromatischen Chromosomenbezirken eine Farbstoffanlagerung verhindert (Comings 1975, Sumner u. Evans 1973). Eine Farbstoffbindung wird jedoch nur dann verhindert, wenn durch spezifische Vorbehandlungen die Protein-DNS-Bindung in euchromatischen Chromosomenbezirken verändert wird (Comings u. Avelino 1975).

Aufgrund der Bindungseigenschaften der Giemsa-Farbstoffe ist zu vermuten, daß auch die G-Bandenfärbungen mit spezifischen Vorbehandlungen auf einer unterschiedlichen Kationenaffinität bestimmter Chromosomenabschnitte beruhen. Durch spezifische Vorbehandlungsschritte wird der quantitative Unterschied der Kationenaffinität von Eu- und Heterochromatin, den sich die Bandenmethode von Walther zunutze macht, verstärkt, sodaß nur noch heterochromatische Chromosomenbereiche angefärbt werden können.

Die Nicht-Histon-Bindung an die DNS in euchromatischen Chromosomenabschnitten dürfte eine entscheidende Bedeutung für die G-Bandenfärbung haben, da unterschiedliche Chromatinverteilung (Blakey u. Filion 1976), selektive Histonablösung (Comings u. Avelino 1974) oder unterschiedliche Basenverteilung, bzw. DNS-Sequenzen (Blakey et al. 1976) keinen Einfluß auf die G-Bandenentstehung haben. Es wird Aufgabe weiterer Untersuchungen sein, Aufschlüsse über die Bindung von Nicht-Histon-Proteinen an eu- und heterochromatische Chromosomenabschnitte zu liefern.

6.7. Chromosomenmodell

Im Folgenden möchte ich ein Chromosomenmodell vorstellen, das auf eigenen und aus der Literatur bekannten Befunden beruht.

Das Modell geht von dem bekannten nackten DNS-Doppelstrang aus, der einen Durchmesser von ca. 20 Å besitzt (Abb. 27a).

Dieser DNS-Doppelstrang windet sich in einer Schleife um das Nukleosom. Ein Nukleosom setzt sich aus acht Histonen zusammen, wobei die Histone H2a, H2b, H3 und H4 jeweils paarweise vorkommen (Abb. 27b modifiziert nach Zinke 1979).

Die Nukleosomen sind durch freie DNS-Abschnitte verbunden. Der Durchmesser dieser Nukleosomenkette beträgt ca. 100 Å (Abb. 27c aus Comings 1978). Superwindung dieser 100 Å Faser führt zu einer 300 Å Faser, die von Finch u. Klug 1976 als "solenoidale" Struktur beschrieben wurde (Abb. 27d). An der Bildung dieser Struktur ist das Histon H1 beteiligt. In dieser 300 Å Faser sind auch andere Nukleosomenanordnungen denkbar (Olins 1978).

Die 300 Å Fasern sind schleifenförmig an einem Chromosomenskelett (Abb. 27e) befestigt (Adolph et al. 1977), oder bilden eine höhere Chromosomenstruktur ohne zentrales Skelett (Sedat u. Manuelidis 1978). Nach Ablösung der Histone von der DNS der Chromosomen ist elektronenmikroskopisch ein zentrales Skelett sichtbar, das vermutlich aus Nicht-Histon-Proteinen besteht. Bei diesem Chromosomenskelett könnte es sich jedoch auch um artefiziell aggregierte Nicht-Histon-Proteine handeln (Okada u. Comings 1979).

Beim Eintauchen des von Histonen befreiten Chromosoms in Wasser kommt es zu einer Schwellung (limitierte Lösung der DNS) des Chromosoms (Abb. 27f). Das Ausmaß der Schwellung wird durch die Fixierung der DNS an dem zentralen Gerüst, das eine artefizielle Nicht-Histon-Aggregation sein könnte, begrenzt. Zu dieser Schwellung kommt es auch beim Eintauchen von Chromosomen in ein Farbstoff-

Puffergemisch, nachdem durch vorangegangene Fixierung mit essigsäurehaltigen Fixativen die Histone vom Chromosom entfernt worden sind. Gleichzeitig binden die in der Pufferlösung enthaltenen Kationen an die Phosphatgruppen der DNS (Abb. 27g).

Im weiteren Verlauf der Färbung dringen Farbstoffmoleküle in das Chromosom ein und verdrängen die Kationen in bestimmten Chromosomenabschnitten von der DNS. Durch die Bindung der Farbstoffmoleküle an die Phosphatgruppen der DNS verliert sie ihren hydrophilen Charakter, es kommt zu einer Verringerung der Löslichkeit und zu einer Zunahme der Kondensation der behandelten Chromosomenabschnitte (Abb. 27h,i). Abb. 27k zeigt die schematische Darstellung der behandelten Chromosomenabschnitte.

Im Verlauf von Pro- und Metaphase kommt es zu einer Kondensation der Chromosomen (Abb. 27 l-o). In der Prophase sind in der markierten Chromosomenregion zwei Banden zu erkennen, die im Verlauf der weiteren Chromosomenkondensation in der Metaphase zu einer Bande verschmelzen. In der späten Metaphase können keine Banden mehr dargestellt werden (Abb. 27p), das Chromosom färbt sich homogen ein.

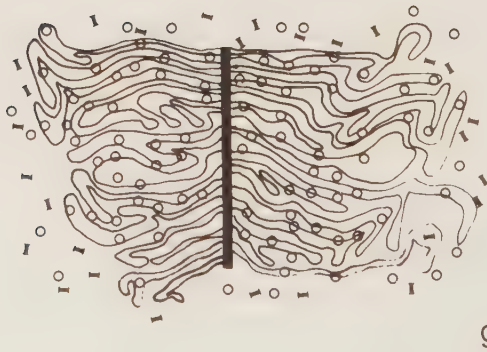
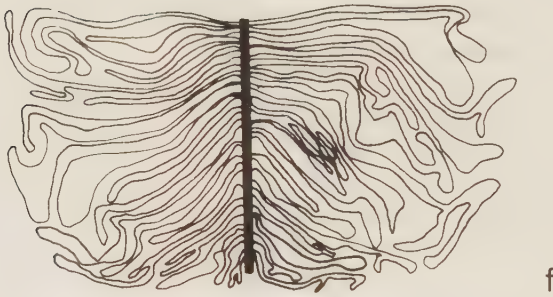
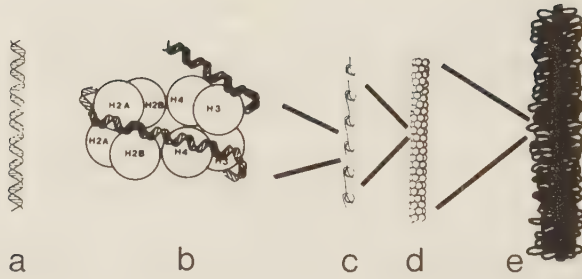
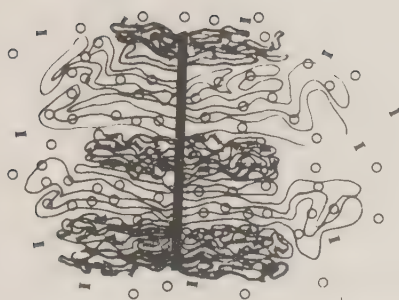
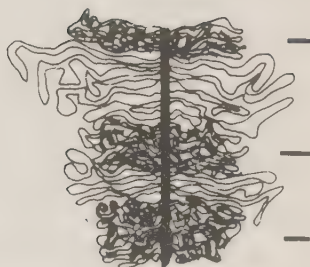


Abb. 27 Chromosomenmodell (Erläuterung im Text)

- ○ Kationen
- ■ Farbstoffpolymere



h



i

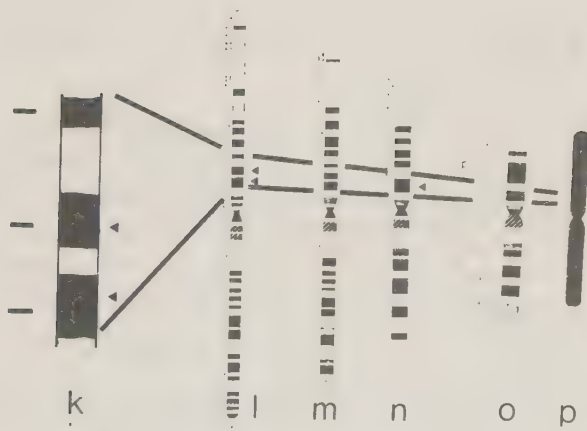


Abb. 27 (Fortsetzung)

7. Zusammenfassung

Durch Beobachtung des Färbevorgangs menschlicher Metaphasechromosomen und durch Analyse der Verarbeitungsschritte und der verschiedenen Faktoren der vorbehandlungsfreien Giemsa-Bandenmethode von Walther konnte der Färbemechanismus dieser G-Bandenfärbung aufgeklärt werden.

Phasenkontrastmikroskopisch konnte ich an ungefärbten menschlichen Metaphasechromosomen Dichteunterschiede feststellen, die jedoch nicht dem G-Bandenmuster entsprechen.

Im Verlauf der Färbung kommt es zu einer Schwellung der Chromosomen, die als limitierte Lösung von chromosomaler DNS in Wasser aufzufassen ist.

Für die G-Bandenentstehung ist die Anwesenheit eines spezifischen Farbstoffkomplexes in bestimmter Konzentration und eine bestimmte Kationenkonzentration in der Färbelösung erforderlich. Zerstörung dieses Farbstoffkomplexes verhindert eine Anfärbung der Chromosomen. Osmolarität, pH und Anionenkonzentration haben für die G-Bandenentstehung keine entscheidende Bedeutung.

Der selektive Färbevorgang beruht auf einer Konkurrenzreaktion von Farbstoffpolymeren und Kationen um die Phosphatgruppen der DNS, wobei die Farbstoffanlagerung von der Bindungsstärke der Kationen an die DNS abhängig ist. Die differentielle Anfärbung bestimmter Bezirke auf fixierten Metaphasechromosomen beruht daher auf der unterschiedlichen Kationenbindungsfähigkeit von Eu- und Heterochromatin. Diese unterschiedliche Kationenaffinität war bisher nicht bekannt.

Es wird ein Chromosomenmodell vorgestellt, das aus der Literatur bekannte Befunde und eigene Untersuchungsergebnisse zusammenfaßt.

8. Literaturverzeichnis

- 1 Adolph, K.W., S.M.Cheng, U.K.Laemmli: Role of Nonhistone Proteins in Metaphase Chromosome Structure. Cell 12, 805-816 (1977)
- 2 Alfi, O.S., R.Menon: A rapid C-band staining technique for chromosomes. I. Lab. Clin. Med. 82, 692-694 (1973)
- 3 Arakaki, D.T., R.S. Sparkes: Microtechnique for Culturing Leucocytes from Whole Blood. Cytogenetics 2, 57 (1963)
- 4 Arrighi, F.E., T.C.Hsu: Localization of Heterochromatin in Human Chromosomes. Cytogenetics 10, 81-86 (1971)
- 5 Arrighi, F.E., T.C.Hsu, P.Saunders, G.F.Saunders: Localization of repetitive DNA in the chromosomes of *Microtus agrestis* by means of in situ hybridization. Chromosoma 32, 224 (1970)
- 6 Bak, A.L., J.Zeuthen: Higher-order Structure of Mitotic Chromosomes. Cold Spring Harbor, Symp. Quant. Biol. 42, 367-377 (1978)
- 7 Bath, D.W.: Surface Ultrastructure of Trypsin-Banded Chromosomes. Exp. Cell Res. 98, 262-268 (1976)
- 8 Beil, B., Limon: The Effect of Cacodylate Buffer on Morphological Differentiation of Human Chromosomes. Genetic Polonica 16, 117-122 (1975)

- 9 Bhasin,M.K., W.Foerster: A Simple Banding Technique for Identification of Human Metaphase Chromosomes. Humangenetik 14, 247-250 (1972)
- 10 Blakey,D.H., W.G.Filion: Differential Giemsa Staining in Plants. Chromosoma 56, 191-197 (1976)
- 11 Blakey,D.H., W.G.Filion, P.A.Horgen: Differential Giemsa Staining in Plants. Exp.Cell Res. 101 278-282 (1976)
- 12 Bloom,S.E., C.Goodpasture: An Improved Technique for Selective Silver Staining of Nucleolar Organizer Regions in Human Chromosomes. Humangenetik 34, 199-206(1976)
- 13 Bobrow,M., K.Madan, P.L.Pearson: Staining of Some Specific Regions of Human Chromosomes, particularly the Secondary Constriction of No.9. Nature New Biology 238 122-124 (1972)
- 14 Bostock,C.J., S.Christie: Quinacrine Fluorescence Staining of Chromosomes and its Relationship to DNA Base Composition. Exp.Cell Res. 86, 157-161 (1974)
- 15 Brasch,K. G.Setterfield, J.M.Neelin: Effects of Sequential Extraction of Histone Proteins on Structural Organization of Avian Erythrocyte and Liver Nuclei. Exp.Cell Res. 74, 27-41 (1972)
- 16 Brasch,K.: Studies on the Role of Histones H1 (f1) and H5 (f2c) in chromatin Structure. Exp.Cell Res. 101, 396-410 (1976)

- 17 Brody, Th.: Histones in Cytological Preparations.
Exp. Cell Res. 85, 255-263 (1974)
- 18 Brown, R.L.: The Possible Role of Histones in the
Mechanism of Chromosomal G-Banding.
Science 189, 1090-1091 (1975)
- 19 Burkholder, G.D.: The Ultrastructure of G- and C-Banded
Chromosomes. Exp. Cell Res. 90, 269-278 (1975)
- 20 Burkholder, G.D., M.G. Weaver: DNA Protein Interactions
and Chromosome Banding. Exp. Cell Res. 110,
251-262 (1977)
- 21 Burton, D.R., J.E. Hyde, I.O. Walker: Histones F2a1 and
F3 Interact reversibly and cooperatively with
DNA to form equimolar complex in chromatin.
FEBS Letters 55, 77-80 (1975)
- 22 Bustin, M., P.D. Kurth, E.N. Moudrianakis, D. Goldblatt,
R. Sperling, W.B. Rizzo: Immunological Probes for
Chromatin Structure. Cold Spring Harbor,
Symp. Quant. Biol. 42, 379-388 (1978)
- 23 Bustin, M., H. Yamasaki, D. Goldblatt, M. Shani, E. Huberman,
L. Sachs: Histone Distribution in Chromosomes
revealed by antihistone sera. Exp. Cell Res. 97,
440-444 (1976)
- 24 Calderon, D., W. Schnedl: A Comparison between Quinacrine
Fluorescence Banding and ^3H -Thymidine Incorporation
Patterns in Human Chromosomes. Humangenetik 18,
63-70 (1973)

- 25 Capanna, E., C.de Martino, P.G.Natali: Contractile Proteins in the Synaptonemal Complex of Vertebrates. 7th Intern.Chromosome Conference Oxford, p.58, 2.1.2.(1980)
- 26 Caspersson,T., S.Farber, G.E.Foley, J.Kudynowski, E.J.Modest, E.Simonsson, U.Wagh, L.Zech: Chemical Differentiation along Metaphase Chromosomes. Exp. Cell Res. 49, 219-222 (1967)
- 27 Caspersson,T., L.Zech, J.Modest, G.E.Foley, U.Wagh, E.Simonsson: Chemical Differentiation with Fluorescent Alkylating Agents in Vicia Faba Metaphase Chromosomes. Exp. Cell Res. 58, 128-140 (1969)
- 28 Caspersson,T., L.Zech, C.Johansson, E.J.Modest: Identification of Human Chromosomes by DNA-binding Fluorescent Agents. Chromosoma 30, 215-227 (1970)
- 29 Chapelle,A.de la, J.Schröder, R.K.Selander, K.Steustrand: Differences in DNA Composition along Mammalian Metaphase Chromosomes. Chromosoma 42, 365-382 (1973)
- 30 Chaudhuri,J.P., W.Vogel, I.Voiculescu, U.Wolf: A Simplified Method of Demonstrating Giemsa-Band Pattern in Human Chromosomes. Humangenetik 14, 83-84 (1971)
- 31 Chicago Conference 1966: Standardization in Human Cytogenetics. Birth Defects: Original Article Series, vol.II, No.2, New York: The National Foundation (1966)
- 32 Chuprewich,T.W. et al.: Chromosomal Protein and C-Banding. Lancet 1453-1454 (1973)

- 33 Cole,R.D., G.M.Lawson, M.W.Hsiang: H1 Histone and the
Condensation of Chromatin and DNA. Cold Spring Harbor,
Symp.Quant.Biol 42, 253-263 (1978)
- 34 Comings,D.E., E.Mattoccia: DNA of Mammalian and Avian
Heterochromatin. Exp.Cell Res. 71, 113-131 (1972)
- 35 Comings,D.E., E.Avelino, T.A.Okada, H.E.Wyandt:
The Mechanism of C- and G-Banding of Chromosomes.
Exp.Cell Res. 77, 469-493 (1973)
- 36 Comings,D.E., E.Avelino: Mechanisms of Chromosome Banding.
II.Evidence that Histones are not involved.
Exp.Cell Res. 86, 202-205 (1974)
- 37 Comings,D.E., T.A.Okada: Mechanisms of Chromosome Banding
VI.Whole Mount Electron Microscopy of Banded
Metaphase Chromosomes and a Comparison with Pachytene
Chromosomes. Exp.Cell Res. 93, 267-274 (1975)
- 38 Comings,D.E., E.Avelino: Mechanisms of Chromosome Banding.
VII.Interaction of Methylene Blue with DNA and
Chromatin. Chromosoma 51, 365-379 (1975)
- 39 Comings,D.E., B.W.Kovacs, E.Avelino, D.H.Harris:
Mechanisms of Chromosome Banding. V.Quinacrine Banding.
Chromosoma 50, 111-145 (1975)
- 40 Comings,D.E.: Mechanisms of Chromosome Banding.
IV.Optical Properties of the Giemsa Dyes.
Chromosoma 50, 89-110 (1975)

- 41 Comings,D.E., D.C.Harris: Nuclear Proteins. I. Electrophoretic Comparison of Mouse Nucleoli, Heterochromatin, Euchromatin and Contractile Proteins. Exp. Cell Res. 96, 161-179 (1975)
- 42 Comings,D.E., M.E. Drets: Mechanisms of Chromosome Banding. IX. Are Variations in DNA Base Composition Adequate to Account for Quinacrine, Hoechst 33258 and Daunomycin Banding? Chromosoma 56, 199-211 (1976)
- 43 Comings,D.E., T.A.Okada: Nuclear Proteins. III. The Fibrillar Nature of the Nuclear Matrix. Exp. Cell Res. 103, 341-360 (1976)
- 44 Comings,D.E., D.C.Harris, T.A.Okada, G.Holmquist: Nuclear Proteins. IV. Deficiency of Non-histone Proteins in Condensed Chromatin of *Drosophila virilis* and Mouse. Exp. Cell Res. 105, 349-365 (1977)
- 45 Comings,D.E.: Mechanisms of Chromosome Banding and Implications for Chromosome Structure. Ann.Rev.Genet. 12, 25-46 (1978)
- 46 Craig-Holmes,A.P., M.W. Shaw: Polymorphism of Human Constitutive Heterochromatin. Science 174, 702-704 (1971)
- 47 Crick,F.H.C., A. Klug :Kinky Helix,Nature 255
- 48 Curtis,D.J., R.W.Horobin: Staining Banded Human Chromosomes with Romanovsky Dyes: Some Practical Consequences of the Nature of the Stain. Humangenetik 26, 99-104 (1975)
- 49 Daumer,K.: Genetik/Bayr. Schulbuchverlag (1977)

- 50 Denver Report 1960: A Proposed Standard System of Nomenclature of Human Mitotic Chromosomes. Lancet I, 1063-1065 (1960)
- 51 Dev,V.G., D.Warburton, O.J.Miller, B.F.Erlanger, S.M.Beiser: Consistent Pattern of Binding of Anti-Adenosine Antibodies to Human Metaphase Chromosomes. Exp. Cell Res. 74, 288-293 (1972)
- 52 Dick,C., E.W.Johns: The Effect of Two Acetic Acid Containing Fixatives on the Histone Content of Calf Thymus Deoxyribonucleoprotein and Calf Thymus Tissue. Exp. Cell Res. 51, 626-632 (1968)
- 53 Drets,M.E., M.W.Shaw: Specific Banding Patterns of Human Chromosomes. Proc.Nat.Acad.Sci. 68, 2073-2077 (1971)
- 54 Drets,M.E., G.A.Folle, D.E.Comings: Mechanisms of Chromosome Banding. X. Chromosome and Nuclear Changes Induced by Photo-oxidation and their Relation to R-Banding with Anti-C Antibodies. Chromosoma 69, 101-112 (1978)
- 55 DuPraw,E.J.: DNA and Chromosomes. Holt, Rinehart, Winston, (1970)
- 56 Dutrillaux,B., J.de Grouchy, C.Finaz, J.Lejeune: Mise en Evidence de la Structure Fine des Chromosomes Humains par Digestion Enzymatique (Pronase en particulier). Compt.Re.Acad.Sci.Paris, t.273, 587-588 (1971)
- 57 Dutrillaux,B., J.Lejeune: Sur une nouvelle technique d'analyse du caryotype humain; C.R. Acad. Sci. Paris 272, 2638-2640 (1971)

- 58 Dutrillaux,B.: Nouveau système de marquage chromosomique:
Les bandes T. Chromosoma 41, 395-402 (1973)
- 59 Dutrillaux,B., J.Lejeune: New techniques in the study of
human chromosomes: Methods and applications,in:Advan-
ces in Human Genetics. Vol.5 (H.Harris and K.Hirsch-
horn,eds.),pp. Plenum Press New York, 119-156 (1975)
- 60 Eiberg,H.: G,R and C Banding Patterns of Human Chromosomes
Produced by Heat Treatment in Organic and Inorganic
Salt Solutions. Clinical Genetics 4, 556-562 (1973)
- 61 Elgin,S.C.R., J.Bonner: Partial Fractionation and Chemi-
cal Characterisation of the major Nonhistone Chromo-
somal Proteins. Biochemistry 11, 772 (1972)
- 62 Elgin,S.C.R., H.Weintraub: Chromosomal Proteins and Chro-
mosomal Structure. Annual Review of Biochemistry 44,
726-773 (1975)
- 63 Fellenberg,G.: Chromosomale Proteine. Verlag E.Ulmer,
Stuttgart 1974
- 64 Felsenfeld,G.: Chromatin. Nature 271, 115 (1978)
- 65 Filip,D.A., C.Gilly, C.Mouriquand: The Metaphase Chromo-
some Ultrastructure. Exp.Cell Res.92, 245-252 (1975)
- 66 Fillion,W.G.: Differential Giemsa Staining in Plants.
Chromosoma 49, 51 (1974)
- 67 Finch,J.T., L.C.Lutter, D.Rhodes, R.S.Brown, B.Rushton,
M.Levitt, A.Klug: Structure of Nucleosome Core
Particles of Chromatin. Nature 269, 29-36 (1977)

- 68 Finch, J.T., A.Klug: Solenoidal model for superstructure in chromatin (1976). *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 73:1897
- 69 Flemming, W. Beiträge zur Kenntnis der Zelle und ihrer Lebenserscheinungen. III. *Arch.Mikroskop.Anat.* 20, 1-86 (1881)
- 70 Ford, C.E., J.L.Hamerton: The Chromosomes of Man. *Nature* 178, 1020-1023 (1956)
- 71 Francke, U., N.Oliver: Quantitative analysis of high-resolution Trypsin-Giemsa bands on human prometaphase chromosomes. *Hum.Genetic* 45, 137-165 (1978)
- 72 Franke, W.W., B.Deumling, H.Zentgraf: Losses of Material during Cytological Preparation of Nuclei and Chromosomes. *Exp.Cell Res.* 80, 445-449 (1973)
- 73 Funaki, K., S.Matsui, M.Sasaki: Location of nucleolar organizers in animal and plant chromosomes by means of an improved N-banding technique. *Chromosoma* 49, 357 (1975)
- 74 Galbraith, W., P.N.Marshall, J.W.Bacus: Microspectrophotometric Studies of Romanowsky Stained Blood Cells. *Journal of Microscopy* 119, 313-330 (1980)
- 75 Gaubatz, J., R.Hardison, J.Murphy, M.E.Eichner, R.Chalkley: The Role of H1 in the Structure of Chromatin. Cold spring Harbor, *Symp.Quant. Biol.* 42, 265-271 (1978)
- 76 German, J.L.: DNA Synthesis in Human Chromosomes. *Transact. N.Y.Acad.Sci.* 24, 295-407 (1962)

- 77 Gilbert,C.W., S.Muldal, L.G.Lajtha, J.Rowley:
Time Sequence of Human Chromosome Duplication.
Nature 195, 869-873 (1962)
- 78 Goldblatt,D., M.Bustin: Exposure of Histone Anti-
genetic Determinants in Chromatin.
Biochemistry 14, 1689-1695 (1975)
- 79 Goodpasture,C., S.E.Bloom: Visualization of nucleolar
organizer regions in mammalian chromosomes
using silverstaining. Chromosoma 53, 37-50 (1975)
- 80 Gormley,I.P., A.Ross: Surface Topogryphy of Human
Chromosomes Examined at each Stage during ASG
banding Procedure. Exp. Cell Res. 74, 584-585(1972)
- 81 Cormley,I.P., A.Ross: Studies on the Relationship of
a Collapsed Chromosomal Morphology to the
Production of Q- and C-Bands. Exp.Cell Res.98,
152-158 (1976)
- 82 Gosden,J.R., A.R.Mitchell, R.A.Buckland, R.P.Clayton,
H.J.Evans: The Location of four Human satellite
DNAs on Human chromosomes. Exp.Cell Res.92,
148-158 (1975)
- 83 Hamerton,J.L.: Chromosome Band Nomenclature-The
Paris-Conference 1971. Nobel 23, Chromosome
Identification 90-95 (1973)
- 84 Harbers,E.: Nucleinsäuren. Georg Thieme-Verlag,
Stuttgart 1975

- 85 Hatfield, J.M.R., K.W.C. Peden, R.M. West: Binding of Quinacrine to the Human Y-Chromosome. *Chromosoma* 52, 67-71 (1975)
- 86 Heitz: Das Heterochromatin der Moose. *I. Jahrbuch Wiss. Bot.* 69, 762-818 (1928)
- 87 Hewish, D.R., L.A. Burgoyne: Chromatin Substructure. The Digestion of Chromatin DNA at Regularly spaced sites by a nuclear Desoxyribonuclease. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 52, 504 (1973)
- 88 Holmquist, G.P., D.E. Comings: Histones and G-Banding of Chromosomes. *Science* 193, 599-600 (1976)
- 89 Holmquist, G.P.: The Mechanism of C-Banding: Depurination and β -Elimination. *Chromosoma* 72, 203-224 (1979)
- 90 Howell, W.M., T.E. Denton: Negative Silver Staining in A-T and Satellite DNA-rich Regions of Human Chromosomes. *Chromosoma* 57, 165-169 (1976)
- 91 Howell, W.M., T.C. Hsu: Chromosome Core Structure Revealed by Silver Staining. *Chromosoma* 73, 61-66 (1979)
- 92 Hozier, J., M. Renz, P. Nehls: The Chromosome Fiber: Evidence for an Ordered Superstructure of Nucleosomes. *Chromosoma* 62, 301-317 (1977)
- 93 Hsu, T.C.: Constitutive Heterochromatin (C-Band) Technique. *Nobel* 23, Chromosome Identification 32-33 (1973)

- 94 Hsu,T.C., F.E.Arrighi, G.F.Saunders: Compositional Heterogeneity of Human Heterochromatin. Proc.Nat. Acad.Sci.USA 69, 1461-1466 (1972)
- 95 Hsu,T.C.: Longitudinal Differentiation of Chromosomes. Ann.Rev. of Gen.7, 153-176 (1974)
- 96 Hsu,T.C., S.E.Spirito, M.L.Pardue: Distribution of 18 + 28 S ribosomal genes in mammalian genomes. Chromosoma 53, 25-36 (1975)
- 97 Hyde,J.E., I.O.Walker: Covalent Cross-Linking of Histones in Chromatin. FEBS Letters 50, 150-154 (1975)
- 98 Jones,K.W., J.Prosser, G.Corneo, E.Ginelli: The chromosomal location of human satellite DNA III. Chromosoma 42, 445-451 (1973)
- 99 Jones,K.W., I.F.Purdom, J.Prosser, G.Corneo: The Chromosomal Localisation of Human Satellite DNA I. Chromosoma 49, 161-171 (1974)
- 100 Kato,H., K.Moriwaki: Factors Involved in the Production of Banded Structures in Mammalian Chromosomes. Chromosoma 38,105-120 (1972)
- 101 Kongsuwan,K., R.D.Smyth: DNA loss during C-Banding of chromosomes of *Lilium longiflorum*. Chromosoma 68 59-72 (1978)
- 102 Korf,B.R., B.E.Schuh, M.J.Salwen, D.Warburton, O.J.Miller: The role of trypsin in the pre-treatment of Chromosomes for Giemsa Banding. Hum.Genet.31, 27-33 (1976)

- 103 Kornberg,R.D., J.O.Thomas: Chromatin structure:Oligomers of the histones. Science 184, 865-867 (1974)
- 104 Kornberg,R.D.: Chromatin Structure: A Repeating Unit of Histones and DNA. Science 184, 868-871 (1974)
- 105 Kornberg,R.D.: Structure of Chromatin. Ann.Rev.Biochem. 46, 931-954 (1977)
- 106 Laemmli, U.K., S.M.Cheng, K.W.Adolph, J.R.Paulson, J.A.Brown, W.R.Baumbach: Metaphase Chromosome Structure: The Role of Nonhistone Proteins. Cold Spring Harbor Symp.Quant.Biol.42, 351-360 (1978)
- 107 Lampert,F.: Coiled Supercoiled DNA in Critical Point Dried and Thin Sectioned Human Chromosome Fibres Nature. New Biology 234, 287-288 (1971)
- 108 Lewis,P.N.: Histone-Histone Interactions I. An Electrophoretic Study. Can. J. Biochem.54, 641-649 (1976)
- 109 Li, H.J.: A Model for Chromatin Structure. Nuc.Acids Res.2, 1275-1289 (1975)
- 110 Limon,J., R.-K.Selander, A. de la Chapelle: Molecular Basis of Chromosome Banding. Exp.Cell Res. 104, 449-453 (1977)
- 111 Löhr,W., I.Sohmer, D.Wittekind: The Azure Dyes: Their Purification and Physicochemical Properties. I. Purification of Azure A.Stain Technology 49, 359-367 (1974)

- 112 Lomholt,B., I.Mohr: Human Karyotyping by Heat-Giemsa
Staining and Comparison with Fluorochrome Techniques.
Nature New Biology 234, 109-110 (1971)
- 113 Lubs,H.A., W.H.McKenzie, S.R.Patil, S.Merrick:
New Staining Methods for Chromosomes.
Meth. Cell Biol. 6, 346-380 (1973)
- 114 Luciani,J.M., M.-R.Morazzani, A.Stahl: Identification of
Pachytene Bivalents in Human male Meiosis Using
G-Banding Technique. Chromosoma 52, 275-282 (1975)
- 115 Mace,M.L., Y.Daskal, H.Busch, V.P.Wray: Isolated Meta-
phase Chromosomes: Scanning Electron Microscopic
Appearance of Salt-Extracted Chromosomes.
Cytobios 19, 27-40 (1977)
- 116 Marshall,P.N., S.M.Lewis: Batch Variations in Commercial
Dyes Employed for Romanowsky-Type Staining: A Thin-
Layer Chromatographic Study. Stain Technology 49,
351-358 (1974)
- 117 Matsui,S., M.Sasaki: Differential staining of nucleolus
organizers in mammalian chromosomes.
Nature (London) 246, 148-150 (1973)
- 118 McKay,M.R.C.: The Mechanisms of G and C Banding in
Mammalian Metaphase Chromosomes. Chromosoma 44,
1-14 (1973)
- 119 McKenzie,W.H., H.A.Lubs: An Analysis of the Technical
Variables in the Production of C Bands.
Chromosoma 41, 175-182 (1973)

- 120 Merck,E., Darmstadt, persönl. Briefwechsel 1975
- 121 Merck,E., Darmstadt, persönl. Briefwechsel 1977
- 122 Miescher,F.: Über die chemische Zusammensetzung der Eiterzellen. Hoppe-Seyler's Medicinisch-chem. Untersuchungen, 441-460 (1871a)
- 123 Miescher,F.: Die Kerngebilde im Dotter des Hühner-eies. Hoppe-Seyler's Medicinisch-chem. Unter-suchungen, 502-509 (1871b)
- 124 Miller,O.J., R.R.Schreck, S.M.Beiser, B.F.Erlanger: Immunofluorescent Studies of Chromosome Banding with Antinucleoside Antibodies. Nobel Symposium 23, Chromosome Identification, 43-47 (1972)
- 125 Modest,E.J.: Fluorescent Banding Agents. Nobel Sym-posium 23, Chromosome Identification, 323-326 (1973)
- 126 Møller,A.R., H.Nilsson: Computerized Statistical Ana-lysis of Banding Patterns. Nobel Symposium 23, Chromosome Identification, 56-60 (1973)
- 127 Moorhead,P.S., P.C.Nowell, W.J.Mellman, D.M.Battips, D.A.Hungerford: Chromosome Preparation of Leuco-cytes Cultured from Human Peripheral Blood. Exp. Cell Res. 20, 613-616 (1960)
- 128 Morishima,A., M.M.Grumbach, J.H.Taylor: Asynchronous Duplication of Human Chromosomes and the Origin of Sex Chromatin. Proc. Nat. Acad.Sci.Washington 48, 756-763 (1962)

- 129 Murken, J.D., H. von Wilmowsky: Die Chromosomen des Menschen. Werner Fritsch Verlag München (1973)
- 130 Nagl, W.: Zellkern und Zellzyklen. Ulmer, Stuttgart (1976)
- 131 Nitsch, B., J.D. Murken, H.-J. Brück: Determining Feulgen-DNA of Individual Chromosomes by Fluorescence Cytophotometry with Incident Light. Histochemie 23, 254-265 (1970)
- 132 Noll, M.: Subunit Structure of Chromatin. Nature 251, 249 (1974)
- 133 Noll, M., R.D. Kornberg: Action of Micrococcal Nuclease on Chromatin and the Location of Histone H1. J.Mol.Biol. 109, 393-404 (1977)
- 134 Novel, P.C., D.A. Hungerford: Chromosome Studies on Normal and Leukaemic Human Leucocytes. J.Natl.Cancer Inst. 28, 85 (1960)
- 135 Okada, T.A., D.E. Comings: Mechanisms of Chromosome Banding III. Similarity between G-Bands of Mitotic Chromosomes and Chromomeres of Meiotic Chromosomes. Chromosoma 48, 65-71 (1974)
- 136 Okada, T.A., D.E. Comings: Higher Order Structure of Chromosomes. Chromosoma 72, 1-14 (1979)
- 137 Okada, T.A., D.E. Comings: A Search for Protein Cores in Chromosomes: Is the Scaffold an Artifact? Hum.Genet. 32, 814-832 (1980)

- 138 Olins,A.L., D.E.Olins: Spheroid Chromatin Units
(v-bodies). Science 183, 330 (1974)
- 139 Olins,A.L.: v-Bodies are Close-packed in Chromatin
Fibers. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.42,
325-329 (1978)
- 140 Pachman,U., R.Rigler: Quantum yield of acridines inter-
acting with DNA of defined base sequence.
Exp. Cell Res. 72, 602 (1972)
- 141 Pardue,M.L., J.G.Gall: Chromosomal Localization of
Mouse Satellite DNA. Science 168, 1356-1358 (1970)
- 142 Paris Conference 1971: Standardization in Human Cyto-
genetics. Birth Defects: Original Article Series,
vol.VIII, No.7, New York: The National Foundation
(1972)
- 143 Paris Conference 1971, Supplement 1975 : Cytogenet.
Cell Genet. 15, 201-238 (1975)
- 144 Patil, S.R., S.Merrick, H.A.Lubs: Identification of
Each Human Chromosome with a Modified Giemsa Stain.
Science 173, 821-822 (1971)
- 145 Paulson, S.R., U.K.Laemmli: The Structure of Histone-
Depleted Metaphase Chromosomes. Cell 12, 817-828
(1977)
- 146 Pearson,P.L., M.Bobrow, C.G.Vosa: Technique for Identi-
fying Y Chromosomes in Human Interphase Nuclei.
Nature 226, 78-80 (1970)

- 147 Pederson, T., J.S. Bhorjee: A Special Class of Non-Histone Protein Tightly Complexed with Template-Inactive DNA in Chromatin. *Biochemistry* 14, 3238-3242 (1975)
- 148 Pothier, L., J.F. Gallagher, C.E. Wright: Histones in Fixed Cytological Preparations of Chinese Hamster Chromosomes Demonstrated by Immunofluorescence. *Nature* 255, 350-352 (1975)
- 149 Rabinowitch, E., L.F. Epstein: Polymerization of Dyestuffs in Solution. Thionine and Methylene Blue. *I. Am. Chem. Soc.* 63, 69-78 (1941)
- 150 Rattner, B.A. Hamkalo: Higher Order Structure in Metaphase Chromosomes. *Chromosoma* 69, 363-372 (1978)
- 151 Renz, M., P. Nehls, J. Hozier: Involvement of Histone H1 in the Organization of the Chromosome Fiber. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 1879 (1977)
- 152 Renz, M., P. Nehls, J. Hozier: Histone H1 Involvement in the Structure of the Chromosome Fiber. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 42, 245-252 (1978)
- 153 Retief, A.E., R. Rüchel: Histones Removed by Fixation; Their Role in the Mechanism of Chromosomal Banding. *Exp. Cell Res.* 106, 233-237 (1977)
- 154 Rigler, R.: Interactions between Acridines and DNA. *Nobel Symposium* 23, Chromosome Identification, 335-341 (1973)

- 155 Rodman, T.C., S.Tahiliani: The Feulgen Banded Karyotype of the Mouse: Analysis of the Mechanisms of Banding. Chromosoma 42, 37-56 (1973)
- 156 Romeis, B.: Mikroskopische Technik. R.Oldenbourg Verlag, München-Wien (1968)
- 157 Ross, A., I.P.Gormley: Examination of Surface Topography of Giemsa-Banded Human Chromosomes by Light and Electron Microscopic Techniques. Exp. Cell Res. 81, 79-86 (1973)
- 158 Rowley, J.D., W.F.Bodmer: Relationship of Centromeric Heterochromatin to Fluorescent Banding Patterns of Metaphase Chromosomes in the Mouse. Nature 231, 503-505 (1971)
- 159 Ruzicka, F.: Effect of G-Banding Techniques on the Ultrastructure of Human Chromosomes. Humangenetik 22, 119-126 (1974a)
- 160 Ruzicka, F.: Organization of Human Mitotic Chromosomes. Humangenetik 23, 1-22 (1974b)
- 161 Schnedl, W.: Observations on the Mechanisms of Giemsa Staining Methods. Nobel Symposium 23, 342-345 (1973)
- 162 Schnedl, W.: Banding Pattern of Human Chromosomes. Nature New Biology 233, 93-94 (1971)
- 163 Schuh, B.E., B.R.Korf, M.J.Salwen: Dynamic Aspects of Trypsin-Giemsa Banding. Humangenetik 28, 233-237 (1975)

- 164 Schwarzacher, H.G.: Die Ergebnisse elektronenmikroskopischer Untersuchungen an somatischen Chromosomen des Menschen. *Humangenetik* 10, 195-208 (1970)
- 165 Seabright, M.: A Rapid Banding Technique for Human Chromosomes. *Lancet* 30, 971 (1971)
- 166 Seabright, M., P. Cooke, M. Wheeler: Variation in Trypsin Banding at Different Stages of Contraction in Human Chromosomes and the Definition, by Measurement, of the "Average" Karyotype. *Hum. Genet.* 29, 35-40 (1975)
- 167 Sedat, J., L. Manuelidis: A Direct Approach to the Structure of Eukaryotic Chromosomes. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 42, 331-350 (1978)
- 168 Sehested, J.C.: Giemsa Banding in Metaphase Chromosomes after Pretreatment with Inactivated Trypsin. *Humangenetik* 19, 321-325 (1973)
- 169 Selander, R.-K.: Interaction of Quinacrine Mustard with Mononucleotides and Polynucleotides. *Biochem. J.* 131, 749-755 (1973)
- 170 Selander, R.-K., A. de la Chapelle: Interaction of Quinacrine Mustard with Calf Thymus Histone Fractions. *Biochem. J.* 131, 757-764 (1973)
- 171 Selander, R.-K.: The Binding of Quinacrine Mustard to Nucleic Acids. *Acta Chemica Scandinavica B* 28, 45-55 (1974)
- 172 Seuáñez, H.N.: The Phylogeny of Human Chromosomes. Springer Verlag 1979

- 173 Shiraishi, Y., T.H.Yosida: Banding Pattern Analysis of human Chromosomes by Use of a Urea Treatment Technique. *Chromosoma* 37, 75-83 (1972)
- 174 Sivak, A., S.R.Wolman: Chromosomal Proteins in Fixed Metaphase Cells. *Histochemistry* 42, 345-349 (1974)
- 175 Sollner-Webb, B., G.Felsenfeld: A comparison of the digestion of nuclei and chromatin by staphylococcal nuclease. *Biochemistry* 14, 2915 (1975)
- 176 Sonnenbichler, J., G.W.Bornkamm: Fraktionierung von Kalbsthymus-Chromatin und Charakterisierung eines spezifischen DNA-Protein-Komplexes. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol.Chem.* 348, 1579-1588 (1967)
- 177 Sonnenbichler, J., P.Nobis: Weitere Untersuchungen über einen Nucleinsäuren-Protein-Komplex aus Kalbsthymus-Chromatin. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol.Chem.* 349, 1556-1566 (1968)
- 178 Sonnenbichler, J.: Substructures of Chromosomes. *Nature* 223, 205-206 (1969)
- 179 Sonnenbichler, J.: Advances in chromatin research. *Naturwissenschaften* 66, 244-250 (1979)
- 180 Sperling, K., R.Wiesner: A Rapid Banding Technique for Routine Use in Human and Comparative Cytogenetics. *Humangenetik* 15, 349-353 (1972)

- 181 Sumner, A.T., H. Evans, R. Buckland: New technique for distinguishing between human chromosomes. *Nature, New Biology* 232, 31 (1971)
- 182 Sumner, A.T.: A Simple Technique for Demonstrating Centromeric Heterochromatin. *Exp. Cell Res.* 75, 304 (1972)
- 183 Sumner, A.T., H.J. Evans, R.A. Buckland: Mechanisms Involved in the Banding of Chromosomes with Quinacrine and Giemsa. I. The Effect of Fixation in Methanol-Acetic Acid. *Exp. Cell Res.* 81, 214-222 (1973)
- 184 Sumner, A.T., H.J. Evans: Mechanisms Involved in the Banding of Chromosomes with Quinacrine and Giemsa. II. The Interaction of the Dyes with the Chromosomal Components. *Exp. Cell Res.* 81, 223-236 (1973)
- 185 Sumner, A.T.: Dye Binding Mechanisms in G-Banding of Chromosomes. *J. of Microscopy* 119, 397-406 (1980)
- 186 Tijo, J., A. Levan: The chromosome number of man. *Hereditas* 42, 1-6 (1956)
- 187 Waldeyer, W.: Über Karyokinese und ihre Beziehungen zu den Befruchtungsvorgängen. *Arch. mik. Anat.* 32, 1-122 (1888) (*Trans. Q.J.mic. Sci., N.S.* 30, 159-281)
- 188 Walther, J.U., S. Stengel-Rutkowski, J.-D. Murken: Observations with G-banding of human chromosomes. *Humangenetik* 25, 49-51 (1974)

- 189 Walther, J.U.: Entwicklung einer vereinfachten Chromosomenfärbung zur G-Banden-Darstellung und ihre Anwendung in der Klinisch-zytogenetischen Diagnostik.
Inauguraldissertation zur Erlangung der Doktorwürde, München 1975
- 190 Wang, H.C., S.Fedoroff: Banding in Human Chromosomes Treated with Trypsin. *Nature New Biology* 235, 52-54 (1972)
- 191 Watson, J.D.: Die Doppel-Helix. Rowohlt, Hamburg (1969)
- 192 Weintraub, H., K.Palter, F.Van Lente: Histones H2a, H2b, H3 and H4 Form a Tetrameric Complex in Solutions of High Salt. *Cell* 6, 85-110 (1975)
- 193 Weisblum B., P.L. de Haseth: Quinacrine, A Chromosome Stain Specific for Deoxyadenylate-Deoxythymidylate-Rich Regions in DNA. *Proc.Nat.Acad.Sci. USA* 69, 629-632 (1972)
- 194 Worcel, A.: Molecular Architecture of the Chromatin Fiber. *Cold Spring Harbor Symp.Quant.Biol.* 42, 313-323 (1978)
- 195 Wray, W., M.Mace, Y.Daskal, E.Stubblefield: Metaphase Chromosome Architecture. *Cold Spring Harbor Symp.Quant.Biol.* 42, 361 (1978)
- 196 Wyandt, H.E., D.G.Wysham, S.K.Minden, R.S.Anderson, F.Hecht: Mechanisms of Giemsa-Banding of Chromosomes. I. Giemsa-11 Banding with Azure and Eosin. *Exp.Cell Res.* 102, 85-94 (1976)

- 197 Wyandt,H.E., R.S.Anderson, S.R.Patil, F.Hecht:
Mechanisms of Giemsa-Banding. II. Giemsa
Components and Other Variables in G-Banding.
Hum.Genet. 53, 211-215 (1980)
- 198 Yunis,J.J., O.Sanchez: G Banding and Chromosome
Structure. Chromosoma 44, 15-23 (1973)
- 199 Yunis,J.,O.Sánchez: The G-banded prophase chromo-
somes of Man. Hum.Genet. 27, 167-172 (1975)
- 200 Yunis,J., J.R.Sawyer, D.W.Ball: The characterization
of high-resolution G-banded chromosomes of Man.
Chromosoma 67, 293-307 (1978)
- 201 Yunis,J., D.W.Ball, J.R.Sawyer: G-banding patterns
of high-resolution human chromosomes 6-22,
X and Y. Hum.Genet. 49, 291-306 (1979)
- 202 Zech,L.: Fluorescence Banding Techniques.
Nobel 23, 28 (1973)
- 203 Zinke,M.: A New Model of DNA and Histone Organization
in Chromatin: Explanation of Conformational
Transitions in Chromatin Structure and their
Dissociation. Studia Biophysica Berlin 75,
107-130 (1979)

Lebenslauf

von Manfred Michael Johannes Endres, geboren am 8.8.1953 in Bad Tölz

Eltern: Dr. Ing. Johann Endres, geb. am 31.1.1905

Susanne Endres geb. Heimbach, geb. am 19.10.1927

Geschwister: Angela Endres, geb. am 28.1.1957

Wohnort: 1953-1965 München-Solln, Schieggstraße 6

1965-1978 München-Solln, Sulenstraße 10a

seit 1978 München 2, Thalkirchnerstraße 53

Schul Ausbildung: 1959-1963 Grundschule an der Herterichstr. in Solln

1963-1972 Theresiengymnasium München (Human. Zweig)

Juni 1972 Abitur

Studium: Wintersemester 1972/73 Studium der Biologie an der

LMU München

1973-1974 Zivildienst an der Kinderpoliklinik im

Genetischen Labor München

1974-1977 Tätigkeit als Wissenschaftliche Hilfskraft im

Genetischen Labor der Kinderpoliklinik München

1974-1979 Studium der Humanmedizin an der LMU München

Praktisches Jahr in der Kinderpoliklinik München,

in der II. Medizin. Klinik Großhadern,

und in der Chirurg. Abteilung im Städt.

Krankenhaus Neuperlach

Nov. 1979 Abschluß des Studiums mit dem III. Staatsexamen

1977-1981 Nachtdienste im Seniorenheim Kieferngarten des

Bayer. Roten Kreuzes

Seit 1.2.1980 Arzt an der Genetischen Beratungsstelle der

Kinderpoliklinik München

Seit Sept. 1981 Ausbildungsteilnehmer an der Münchner

Arbeitsgemeinschaft für Psychoanalyse (MAP)

